



Armindo Jorge Alves de Melo

Assessment of pesticide contamination in ground water and vegetables using environment friendly methodologies

Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducentes ao Grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas
com especialização em Nutrição e Química do Alimentos

Trabalho realizado sob a orientação da:
Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira
e co-orientação de:
Doutora Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha
Professora Doutora Olívia Maria de Castro Pinho

Porto
Abril de 2012

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação,
mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Amimindo Jorge Alves de Melo

Agradecimentos

A realização e compilação desta dissertação envolveu apoio, orientação e esforços de muitas pessoas, que contribuíram para que esta experiência fosse extremamente enriquecedora, tanto a nível científico como pessoal. Portanto, gostaria de deixar aqui os meus mais sinceros agradecimentos, a todos aqueles que, de qualquer forma, contribuíram na conclusão deste trabalho.

Inicialmente gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Ferreira pela orientação, apoio, total disponibilidade e confiança que depositou em mim durante todo este trabalho, tornando este percurso mais fácil. Para além disso, desde o primeiro momento estive sempre presente mesmo nos momentos mais difíceis, dando-me motivação, força e otimismo para continuar. Pelos bons momentos partilhados, pela boa amizade que criamos e por tudo o que fez por mim, não tenho palavras suficientes para demonstrar toda a minha gratidão.

À Doutora Catarina Mansilha pela excelente co-orientação e por me receber no laboratório da Unidade de Água e Solos, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, na realização do meu programa de doutoramento. O tempo que lá passei teve uma enorme contribuição no meu conhecimento para a realização deste trabalho, de destacar ainda disponibilidade, confiança e amizade que sempre demonstrou. Aos restantes elementos do laboratório, um enorme obrigado, em especial à Sofia pela sua amizade.

À Professora Doutora Olívia Pinho pela sua co-orientação, apoio constante e perguntas pertinentes neste trabalho, bem como, pela boa disposição e amizade. Fica o registo na memória de momentos nostálgicos, quando relembávamos velhas tradições ou ditados das nossas terras.

A todas as pessoas do Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, e em particular a Dr^a Eulália, por todos os bons momentos e aqueles “5 min” para pensar noutras realidades. À Professora Doutora Susana Casal, a sua constante disponibilidade para solucionar diferentes problemas, bem como os seus sábios conselhos, ao Professor Doutor José Fernandes por todas as condições proporcionadas enquanto responsável pelo laboratório, bem como enquanto condutor da “poderosa chicolateira” em terras perdidas no meio do mar. Ao Doutor Miguel a boa disposição de um enorme “gaiteiro” e à Doutora Sara Cunha toda a disponibilidade demonstrada, tal como ajuda, conselhos e dicas na condução deste trabalho. À Anabela Borges e Eng.^a Anabela Costa todo o apoio e amizade. Não incluída na lei orgânica do laboratório de Bromatologia, mas sempre presente, a Eng.^a Maria Elisa Soares a quem tenho de agradecer a paciência

demonstrada comigo, que poderia ir desde o “simples bater de porta” até à correcção da construção frásica ou dicção, mas o mais importante foi a enorme amizade criada.

Também gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Aguiar pela ajuda nos trabalhos de campo, bem como à associação de agricultores Horpozim, nomeadamente, à Eng^a Inês Ramos, por toda a disponibilidade. Também para os diferentes agricultores que possibilitaram algum do trabalho desenvolvido, em especial ao sr^o António Silva, ao sr^o Flores e a esposa, pela boa disposição sempre demonstrada e por uma porta sempre aberta, que em muita das vezes ainda atrasava o seu trabalho.

De seguida não posso deixar passar em claro todos os meus amigos que sempre me acompanharam e conviveram comigo nos últimos anos, pela boa disposição, pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram e pela ajuda prestada sempre que necessário. É lógico que não vou falar de todos mas não posso deixar de dizer umas palavras a alguns. Começando pela Catarina, por toda a sua ajuda e por estar sempre presente. À Olga, Cristina, Elsa, Carina, Rebeca e Zita pela enorme amizade e sempre ajudam a quebrar a monotonia. À Trini a espanhola mais portuguesa que conheço, por toda a ajuda e amizade. Agora os meus amigos Edgar (“mineiro”) e Luís Filipe pelos bons momentos, discussões ideológicas, bem como trabalho árduo. Também a todas as outras pessoas que passaram pelo laboratório de Bromatologia.

Ao meu amigo David também não podia deixar de escrever umas pequenas palavras, desde um obrigado pelas boleias desde casa, claro “paciência”, disponibilidade e boa disposição. A todos os meus amigos da química-física e as companhias para muitos almoços. A todos os meus amigos do mestrado de Controlo de Qualidade e pelos bons momentos que ainda hoje podemos disfrutar, nos nossos jantares.

Aos meus velhos amigos da Covilhã e Felgueiras, que apesar dos diferentes trajetos, os laços de amizade continuam.

Ao meu Pai, à minha Mãe e à minha Irmã, por todo o seu apoio e confiança, que sempre me ajudaram nos momentos difíceis, e todo o seu trabalho árduo para me proporcionar as condições necessárias para eu ter chegado até aqui.

A toda a minha família por me terem acompanhado desde sempre ajudando-me a crescer, em especial às minhas avós, em que a sua companhia ainda hoje me proporcionam excelentes momentos.

Também um agradecimento muito especial para a Amélia, por toda a ajuda, compreensão, sorriso e paciência, ao longo destes anos.

Por fim, agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter admitido como estudante de doutoramento, disponibilizando todos os meios necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo suporte financeiro referente à bolsa de Doutoramento com referência SFRH/BD/41764/2007 no âmbito do QREN-POPH-Tipologia 4.1 – Formação Avançada, participado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.



*“A vida é uma pedra de amolar: desgasta-nos ou afia-nos,
conforme o metal de que somos feitos.”*

Bernard Cornwell

Resumo

A expansão da utilização de produtos fitofarmacêuticos no combate a pragas, observada a partir das décadas de 50, 60 e 70 do século passado, proporcionou evidentes vantagens agrícolas e económicas. No entanto, devido aos riscos desses compostos para a saúde humana, e aos elevados danos ambientais, a sua aplicação teve que ser moderada. A exposição aos resíduos de pesticidas está associada, a longo prazo, a graves problemas de saúde, tais como, dificuldades respiratórias e aparecimento de cancro. A nível ambiental, o uso intensivo de pesticidas pode levar à degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, causando desequilíbrios biológicos e ecológicos, podendo salientar-se, entre eles a contaminação da água, do ar e do próprio solo. Atualmente, a utilização sustentável de produtos fitofarmacêuticos, continua a ser um ambicioso desafio para o mercado global em que nos inserimos, mesmo após terem sido estabelecidas rigorosas medidas destinadas a reduzir os seus efeitos na saúde humana e no ambiente, sem deixar de assegurar a necessária proteção das culturas.

A União Europeia está atenta e tem aprovado legislação que controla a utilização de produtos fitofarmacêuticos. A proteção dos consumidores tem sido feita através da permanente publicação e atualização dos limites máximos de resíduos tolerados na água e nos alimentos. Adicionalmente, os pesticidas clássicos têm sido substituídos por novas moléculas, que são menos persistentes no ambiente. Estas imposições legais implicam a utilização de métodos analíticos multirresíduo, sensíveis e fiáveis para a monitorização de pesticidas, em diferentes matrizes e em quantidades vestigiais. A preparação destas amostras implica rigorosos procedimentos de extração e purificação para remover interferências de elevado peso molecular, antes de efetuar a análise, geralmente por técnicas de cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta performance.

Nesta dissertação abordou-se a problemática da exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas, através da ingestão de vegetais crus, produzidos em estufa, e da contaminação das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva. Neste contexto, foram desenvolvidas diferentes metodologias analíticas para a análise de resíduos de pesticidas, e aplicadas na monitorização de resíduos em vegetais, que normalmente são ingeridos crus (como a alface e o tomate), bem como em amostras de águas subterrâneas. As metodologias analíticas otimizadas e validadas possuem, em comum, o facto de recorrerem a processos de extração/purificação com baixo consumo de reagentes: (i) extração em fase sólida seguida de cromatografia gasosa com deteção de massa (SPE-GC/MS) foi adequada para a deteção e quantificação de níveis vestigiais de resíduos de pesticidas e estrogénios em águas subterrâneas; (ii) microextração em fase sólida associada a cromatografia líquida de alta performance e deteção por díodos (SPME-HPLC/DAD) permitiu a análise de pesticidas vulgarmente usados na produção de alface; (iii) a associação da técnica de extração de QuEChERS e um processo de

microextração líquido-líquido dispersiva para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de tomate (QuEChERS/DLLME) permitiu elevados fatores de enriquecimento e a realização da separação e quantificação por HPLC/DAD ou GC/MS dependendo dos resíduos de pesticidas que se pretendia analisar.

De forma a garantir a sensibilidade, fiabilidade e rigor dos métodos analíticos desenvolvidos, foi efetuada uma criteriosa otimização e validação dos mesmos. Para tal, nas metodologias de SPME-HPLC/DAD e QuEChERS/DLLME-HPLC/DAD, efetuou-se uma otimização multivariada, com recurso a curvas de superfície de resposta, de forma a selecionar as condições mais favoráveis na extração dos compostos em estudo. A validação foi efetuada através da avaliação dos efeitos de matriz, dos parâmetros de exatidão e precisão, do intervalo de linearidade, e dos limites de deteção e quantificação. Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados na monitorização de resíduos de pesticidas de diferentes matrizes. No caso da monitorização dos resíduos de pesticidas em alface pelo método de SPME-HPLC/DAD, foi possível avaliar os níveis de dissipação de alguns pesticidas desde a sua aplicação nas alfaces até à respetiva colheita, confirmando que as boas práticas agrícolas foram seguidas, e que a concentração dos resíduos, quando existentes, era aceitável para os consumidores, pois não ultrapassavam o limite máximo de resíduo, valor que serviu de base à avaliação de risco. É de realçar que a metodologia otimizada permitiu a quantificação dos pesticidas em teores superiores a 100 mg/kg de alface e em níveis vestigiais. A aplicação da técnica de QuEChERS/DLLME - GC/MS, na monitorização de resíduos de pesticidas em amostras de tomates comercialmente disponíveis, revelou que nenhuma das amostras analisadas ultrapassava o limite máximo de resíduo admitindo, corroborando que com boas práticas agrícolas os consumidores não se encontram expostos a níveis excessivos de resíduos de pesticidas nos vegetais crus.

A monitorização, por SPE-GC/MS, dos resíduos de pesticidas em amostras de água subterrânea, recolhidas em duas zonas distintas de agricultura intensiva, indicou a presença de níveis de resíduos de pesticidas superiores aos parâmetros legais, em alguns pontos de colheita. Observou-se acumulação de resíduos de diversos pesticidas (herbicidas, inseticidas e fungicidas) na região de produção de hortícolas da Póvoa de Varzim e de herbicidas na região vitícola do Douro. A elevada poluição das águas subterrâneas registada em alguns pontos da colheita, resulta de más práticas agrícolas realizadas no passado recente e longínquo, e pode expor as populações destas regiões a níveis excessivos e preocupantes destes resíduos.

Abstract

From the 50s, 60s and 70s of last century, the great expansion of the use of pesticides to combat pests, provided obvious economic and agricultural benefits. However, due to the risks of those compounds to human health and environmental damage caused, its application had to be controlled. The exposure to pesticide residues is associated with long time health problems, such as breathing difficulties and cancer. Environmentally, pesticide use can lead to the degradation of natural resources, sometimes irreversibly, causing biological and ecological imbalances, such as contamination of water, air and soil. Currently, the sustainable use of pesticides remains a challenge for the global market, even after being established stringent measures to reduce its effects on human health and in the environment, while ensuring the necessary crop protection.

The European Union has approved legislation to control pesticide use. Consumer protection has been made through the permanent regulation and updating of maximum residue levels allowed in water and food. Additionally, conventional pesticides have been replaced by new molecules that are less persistent in the environment. These legal impositions need the use of multiresidue analytical methods, sensitive and reliable for monitoring pesticides in different matrices at trace levels. The preparation of these samples requires strict procedures for extraction and purification to remove high molecular weight compounds, before testing, usually by standard gas chromatography or high performance liquid chromatography.

This dissertation addressed the issue of consumer's exposure to pesticide residues through the intake of raw vegetables produced in greenhouses, and the contamination of groundwater in areas of intensive agriculture. For this reason different analytical methodologies were developed for the analysis of pesticide residues and applied in the monitoring of residues in vegetables, which are usually eaten raw (such as lettuce and tomato), as well as in samples of groundwater.

The optimized and validated analytical methods have in common the use of extraction / purification processes with low consumption of reagents: (i) solid phase extraction followed by gas chromatography with mass detection (SPE-GC/MS) was suitable for the detection and quantification of trace levels of pesticide residues and estrogens in groundwater; (ii) solid phase microextraction associated with high performance liquid chromatography and diode-array detection (SPME-HPLC/DAD) allowed the analysis of pesticides commonly used in the growth of lettuce; (iii) the combination of QuEChERS technique with liquid-liquid dispersive microextraction for the analyses of pesticide residues in tomato samples (QuEChERS DLLME) allowed high enrichment factors and its

separation and quantification by HPLC/DAD or GC/MS depending on the pesticide residues which are intended to analyze.

To ensure the sensitivity, reliability and accuracy of analytical methods developed, a careful optimization and validation was performed. To this end, the SPME-HPLC/DAD and QuEChERS/DLLME-HPLC/DAD methodologies were optimized by multivariate optimization using the response surface curves, in order to select the most favorable conditions for extraction of the compounds under study. The validation was performed through the evaluation of matrix effects, the parameters of accuracy and precision, linear range, limits of detection and quantification.

The analytical methods developed were applied to the monitoring of pesticide residues of different matrices. The monitorization of pesticide residues in lettuce by SPME-HPLC/DAD was useful to assess the dissipation of some pesticides between its application and lettuce harvest, confirming that when good agricultural practices were followed, the residue levels, if present, were acceptable to consumers, because the maximum residue level that formed the basis of risk assessment was not exceeded. It should be pointed out that the methodology enable the quantification of pesticide levels higher than 100 mg/kg of lettuce and also trace levels of the same pesticides. By applying the technique of QuEChERS/DLLME-GC/MS in the monitoring of pesticide residues in commercially available samples of tomatoes, it was found that none of the samples analyzed exceeded the maximum residue level, confirming that consumers are not exposed to excessive levels of pesticide residues in raw vegetables.

The monitorization, by SPE-GC/MS, of pesticide residues in groundwater's collected in two different regions devoted to intensive agriculture, revealed some collecting points presenting levels of pesticides higher than the legal parameters. Accumulation of herbicides, insecticides and fungicides was observed in groundwater from Póvoa de Varzim region that has an intensive horticulture activity, whereas groundwater from Douro region was more prone to contamination by herbicides. The pollution observed in some collecting points is an indicator of bad agricultural practices in recent and distant past, and may expose the population of these regions to excessive levels of pesticides.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	vi
Abstract	viii
Índice	x
Índice de figuras	xvi
Índice de tabelas	xx
Lista de acrónimos	xxiv
Enquadramento geral, objetivos e organização da dissertação	xxvii

PARTE I

Capítulo 1.

1. Introdução	3
1.1. Conceitos e classes de pesticidas	4
1.2. Vantagens da utilização de produtos fitofarmacêuticos	8
1.3. Desvantagens da utilização de produtos fitofarmacêuticos	12
1.3.1. Riscos da ingestão de resíduos de pesticidas nos alimentos	14
1.3.2. Riscos ambientais. Contaminação das águas	18
1.4. Métodos de análise de resíduos de pesticidas	21
1.4.1. Amostragem	23
1.4.2. Preparação das amostras	24
1.4.2.1. Extração	24
Extração líquido-líquido (LLE)	25
Extração em fase sólida (SPE)	27
Extração por fluidos supercríticos (SFE)	27
Extração líquida pressurizada (PLE)	28
Extração assistida por micro-ondas (MAE)	28
Dispersão de matriz em fase sólida (MSPD)	29
Microextração em fase sólida (SPME)	29
Extração por QuEChERS	31
Técnicas de microextração líquido-líquido	33
1.4.2.1. Purificação (<i>CleanUp</i>) e concentração da amostra	35
1.4.3. Quantificação e confirmação de resíduos de pesticidas	39
1.4.4. Resíduos de pesticidas em alimentos de origem vegetal	43
1.4.5. Resíduos de pesticidas em amostras ambientais	45
1.5. Referências	47

PARTE II

Capítulo 2.

Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes

Abstract	57
1. Introduction	57
2. Materials and methods	58
2.1. Chemicals and reagents	58
2.2. Standard solutions preparation	58
2.3. SPE procedure	58
2.4. GC/MS analysis	59
3. Theory	60
3.1. Matrix effect	60
3.2. Specificity and selectivity	60
3.3. Calibration and linearity	60
3.3.1. Simple and weighted linear regression models—background	60
3.3.2. Fundamentals of weighted linear regression	60
3.4. Limit of detection and limit of quantification	61
3.5. Range	61
3.6. Precision and accuracy	61
3.6.1. Precision	61
3.6.2. Accuracy	61
3.7. Stability	62
3.8. Robustness	62
4. Results and discussion	62
4.1. GC–MS method optimization	62
4.2. Solid-phase extraction procedure	62
4.3. Matrix effect and extraction efficiency	62
4.4. Validation of the method analytical parameters	62
4.4.1. Specificity and selectivity	63
4.4.2. Calibration curves: linearity and range	63
4.4.3. Precision and accuracy	64
4.4.4. Recovery	65
4.4.5. Stability	65
4.4.6. Robustness	66
5. Conclusions	66
References	66

Capítulo 3.

Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce

Abstract	71
1. Introduction	71
2. Experimental	72
2.1. Chemical and reagents	72
2.2. Sampling strategy	72
2.3. HPLC-DAD conditions	72
2.4. Selection of SPME fibre and desorption conditions	73
2.5. Statistical design of experiments for SPME extraction	73
2.6. SPME method validation and application to real samples	73
3. Results and discussion	73
3.1. HPLC-DAD conditions	73
3.2. Selection of SPME fibre and desorption conditions	74
3.3. Statistical design of experiments for SPME extraction	74
3.4. Calibration and matrix effect evaluation	75
3.5. Real sample analysis	76
4. Conclusions	77
References	77

Capítulo 4.

Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography

Abstract	82
Introduction	83
Experimental	86
Chemicals and reagents	86
HPLC-DAD conditions	87
Combined QuEChERS and DLLME sample preparation procedure	88
Experimental design	89
Results and discussion	90
Optimized HPLC-DAD chromatographic conditions	90
QuEChERS and DLLME parameters selection	91
Co-extracted matrix components: Chromatographic Interferences	94
Experimental design	95
Analytical performance	96
Conclusions	98

References	99
------------	----

Capítulo 5.

Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry

Abstract	115
1. Introduction	116
2. Material and methods	119
2.1 Materials and Reagents	119
2.2 Sampling and Sample preparation	120
2.3 Validation and quality control	121
2.4. Apparatus and GC–MS conditions	121
3. Results and discussion	122
3.1. Sample extraction procedure	122
3.2. Method validation	123
3.3. Analysis of tomato samples	126
4. Conclusions	127
References	127

Capítulo 6.

Capítulo 6.1.

Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality

Abstract	141
Introduction	141
Material and methods	142
Characterization of the Region and Fields	142
Selection of Water Collecting Points	143
Sampling and Laboratorial Analyses	143
Results	143
Discussion	144
Literature Cited	144

Capítulo 6.2.

Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides

Abstract	151
----------	-----

Introduction	151
Material and methods	153
Background of the studied area	153
Selection of water collecting points	153
Sampling and analytical work	153
Description of the data set	154
Statistical analysis of the monitoring results	155
Results and discussion	155
Nitrate, nitrite, potassium, and sodium contents in groundwater	155
Occurrence of pesticides in groundwater	156
Global statistical analysis of data set	162
Conclusions	162
References	162

Capítulo 7.

Groundwater from infiltration galleries used for small public water supply systems: contamination with pesticides and endocrine disruptors

Abstract	167
Materials and Methods	168
Results and Discussion	169
References	172

PARTE III

Capítulo 8.

Otimização e validação de metodologias analíticas multirresíduo para análise de níveis vestigiais de pesticidas em água e vegetais

8.1. Análise de resíduos de pesticidas em água por SPE-GC/MS	179
8.2. Avaliação de pesticidas em alface (<i>Lactuca sativa</i>) por SPME-HPLC/DAD	183
8.3. Avaliação de pesticidas em tomate por QuEChERS-DLLME-HPLC/DAD e QuEChERS-DLLME –GC/MS	187
Referências	191

Capítulo 9.

Avaliação da exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas através da ingestão de vegetais crus, produzidos em estufa

9.1. Monitorização de pesticidas em amostras de alface produzidas em estufa durante o inverno	200
9.2. Monitorização de resíduos de pesticidas em amostras de tomate produzido em estufa durante o inverno	204

Referências	205
-------------	-----

Capítulo 10.

Contaminação das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva	209
---	-----

10.1. Monitoração das concentrações de pesticidas, na água de poços e furos, durante um ano, numa zona de horticultura intensiva	210
--	-----

10.2. Monitorização da qualidade da água de minas numa zona dedicada à cultura da vinha	214
---	-----

Referências	218
-------------	-----

PARTE IV

Capítulo 11.

Conclusões	225
------------	-----

Índice de figuras

Capítulo 1. Introdução

- Figura 1.** Representação esquemática da classificação dos fitofármacos com base na sua origem, modo de ação, natureza química, e as espécies alvo (3, 8). 6
- Figura 2.** Distribuição do mercado dos produtos fitofarmacêuticos expressa em percentagem de valor monetários (%) por tipo de fitofármaco em 2009 (10, 11). 7
- Figura 3.** Implicações do uso contínuo de produtos fitofarmacêuticos (3). 13
- Figura 4.** Esquema geral dos procedimentos necessários para a análise de resíduos de pesticidas em diferentes amostras. 22

Capítulo 2. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes

- Figura. 1** Matrix-standard solutions recoveries (350g/L) calculated considering the areas obtained by direct injection as 100%. The dashed lines represent the range of acceptable recoveries of 70–120%. 63
- Figura 2.** Sums of relative errors ($\sum\%RE$) for simple and weighted calibration curves. 63
- Figura 3.** Percentage of relative errors ($\%RE$) vs. concentration obtained for model 1 ($w_i = 0$) and model 2 ($w_i = s_i^{-2} / \sum_i s_i^{-2} / n$) for estrone. 63
- Figura 4.** Examples of the variation of global uncertainty with the calibration standard concentration. 64
- Figura 5.** Histogram and control chart of the percentage of recovery of atrazine-d5 added to calibration standards and samples. 65

Capítulo 3. Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce

Figura 1. (a) The combined effect of pH and NaCl percentage on the sum of peak area at constant extraction time (30 min); (b) The combined effect of pH and extraction time on the sum of peak area at constant percentage of NaCl (17.6); (c) The combined effect of NaCl percentage and extraction time on the sum of peak area at constant pH (8); (d) The combined effect of pH and extraction time on the desirability at constant percentage of NaCl (17.6).

75

Figura 2. Chromatograms of lettuce samples after SPME extraction under optimum extraction conditions (pH 8; 17.6% NaCl, 30 min extraction time): uncontaminated sample spiked with pesticides. Peak identification and concentration – 1: pirimicarb (56 mg/kg), 2: acetamiprid (56 mg/kg), 3: cyprodinil (5.6 mg/kg), 4: metalaxyl (56 mg/kg), 5: phosmet (8.4 mg/kg), 6: azoxystrobin (11.2 mg/kg), 7: fludioxonil (8.4 mg/kg), 8: fenehexamid (11.2 mg/kg), 9: folpet (8.4 mg/kg), 10: iprodione (22.4 mg/kg), and 11: tolyfluanid (22.4 mg/kg).

76

Capítulo 4. Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography.

Figura 1. (A) Chromatographic separation of 468 the selected group of pesticides added (concentration 1.0 mgkg⁻¹ for dicamba and metalaxyl-M; 0.5 mgkg⁻¹ for 2,4 – D and deltamethrin, 0.1 mgkg⁻¹ for the other nine pesticides) to a sample of organic tomato analysed by HPLC-DAD at their maximum UV absorbance wavelengths (B) Chromatographic separation of a sample of organic tomato sample without addition of pesticides.

108

Figura 2. Effect of different extraction solvents on the total chromatographic peak area of pesticides. Extraction conditions: 5 mL of ultra-pure water with 1 mL of MeCN QuEChERS extract obtained with a tomato sample spiked with a concentration of 3.0mgkg⁻¹ for dicamba and metalaxyl-M; 1.5 mgkg⁻¹ 478 for 2,4 – D and deltamethrin, 0.150 mgkg⁻¹ for the other nine pesticides and 100 µl of each extraction solvent.

109

Figura 3. Effect of pH from aqueous phase on the total chromatographic peak area of pesticides. Extraction conditions: 5 mL of buffer with 1 mL of MeCN QuEChERS extract obtained with a tomato sample spiked with a concentration of 3.0 mgkg⁻¹ for dicamba and metalaxyl-M; 1.5 mgkg⁻¹ for 2,4 – D and deltamethrin, 0.150 mgkg⁻¹ for the other nine pesticides and 100 µl of chloroform as extraction solvent. 110

Figura 4. Response surface estimated for the central composite design of QuEChERS /DLLME optimization: (a) amount of PSA and GCB); (b) chloroform amount, NaCl percentage 111

Capítulo 5. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry.

Figura 1. (A) GC-MS chromatographic separation of pesticides added to a sample of tomato analyzed in selected monitoring ion mode (each pesticide was fortified at the concentrations level 2 tested in recovery experiments, see Table 4, the legend of peaks is also in Table 4) (B) GC-MS chromatogram of C1 sample with extracted ion chromatograms in SIM mode of Fenhexamid (ions 97, 177, 179) and Azoxystrobin (ions 344, 388, 403). 136

Figura 2. Distribution of the 30 pesticides according to percentage of matrix effects in tomato samples. 137

Capítulo 6.1. Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality.

Figura 1. Dunes with pines, masseira field as they were at the beginning of XX century and enlarged masseira with greenhouse as it has been since 80's. 148

Figura 2. Nitrate content oscillation in bored and drilled wells in each sampling date. 148

Figura 3. Dendogram obtained from cluster analysis of dug wells and drilled wells according to pesticides quantified in each collection date. 150

Capítulo 6.2. Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides.

Figura 1. Map of vulnerable zone no. 1 (VZ1) designed in the framework of the 91/676/EEC Directive and showing the distribution of the collecting points considered in the present.

154

Figura 2. Dendrogram produced by cluster analysis of data organized with eight rows corresponding to the four dug wells and four drilled wells and the column vectors (X1, X2, X3, X4, X5) representing the frequency of pesticides above the LOQ in each collection date. Single linkage method with Euclidean distances was used.

160

Figura 3. Score plot of the first two PCs performed using the concentrations of pesticides. BW1, BW2, BW3, BW4—dug wells; DW1, DW2, DW3, DW4—drilled wells.

161

Capítulo 7. Groundwater from Infiltration Galleries Used for Small Public Water Supply Systems: Contamination with Pesticides and Endocrine Disruptors.

Figura 1. Schematic localization of 9 infiltration galleries (fountains for public supply) sampled in the ‘Alto Douro Demarcated Wine region’ (marked on dark grey).

169

Índice de tabelas

Capítulo 1. Introdução

Tabela 1. Tipos de produtos fitofarmacêuticos classificados de acordo com o efeito desejado.	5
Tabela 2. Representação dos benefícios primários e secundários, decorrentes da utilização dos produtos fitofarmacêuticos (12).	10
Tabela 3. Classificação dos produtos fitofarmacêuticos, por parte da OMS, de acordo com a sua toxicidade aguda (adaptado de (20)).	15
Tabela 4. Os três níveis de teste para avaliar a toxicidade de pesticidas em organismos não-alvo.	19

Capítulo 2. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes.

Tabela 1. Optimized GC–MS acquisition method parameters for 32 compounds and atrazine-d5. Analytes, retention times (Rt), precursor ions and product ions for qualitative and quantitative analysis.	59
Tabela 2. Method validation data. Calibration parameters and related uncertainties.	64
Tabela 3. Intra-day, inter-day and instrumental precision (% CV) and accuracy (% Bias).	65
Tabela 4. Mean values of the experimental concentrations and recoveries for each concentration level (n≥3).	66

Capítulo 3. Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce

Tabela 1. 2 ³ full factorial CCD experimental design matrix, actual and the	74
---	----

predicted results.

Tabela 2. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for sum of peak area.

74

Tabela 3. Maximum residue levels (MRLs) for the pesticides under study, partition coefficients (K_{ow}), detection and quantification limits and calibration curve parameters: linear range tested for each pesticide, linearity [peak area = $bC + a$] and respective determination coefficients (r^2).

76

Capítulo 4. Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography.

Tabela 1. Independent variables and their coded values used for optimization.

103

Tabela 2. List of chemical characteristics of the pesticides under study: chemical group, molecular mass (MM), log of octanol-water coefficient (log K_{ow} - at pH=7 and 20 °C) and acid dissociation constant (pK_a) at 25 °C.

104

Tabela 3. Predicted response value of each studied compound and experimental results using 100 mg PSA, 5.26 mg GCB, 4% NaCl and 400 μ L of chloroform.

105

Tabela 4. Calibration parameters, related standard deviations and uncertainties were calculated according (Miller and Miller, 2005). The standards were prepared under the same conditions applicable to the samples. Each test was performed in at least five independent experiments.

106

Tabela 5. Results of the analysis carried out to evaluate the accuracy and repeatability of the purposed QuEChERS and DLLME method combined with HPLC-DAD for the selected pesticides in tomato samples ($n = 3$ for intraday assays and $n = 9$ for interday assays).

107

Capítulo 5. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry.

Tabela 1. MS conditions for the analysis of 30 pesticides and IS (Time windows (TW) and ions selected in SIM mode, quantification ions in bold), respective molecular weight (MM), maximum residue level in EU legislation (MRL) and retention time (t_R) 132

Tabela 2. Method validation data. Calibration parameters. 133

Tabela 3. Results of the analysis carried out to evaluate the accuracy and repeatability. 134

Tabela 4. Results obtained for the six pesticides detected in tomato samples. 135

Capítulo 6.1. Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality.

Tabela 1. Occurrence of pesticides in all water samples (n=32). Limit of detection (LOQ) and limit of quantification (LOQ) are expressed in ng/L. Chemical parameters. 149

Tabela 2. Number of pesticides above the limit of quantification (LOQ) present in each sample. 150

Capítulo 6.2. Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides.

Tabela 1. Mean values, range of concentration, and the month of maximal and minimal values during 1 year for nitrate, nitrite, potassium, and sodium organized by collecting points. 157

Tabela 2. Occurrence of pesticides in all water samples (n=40). 158

Tabela 3. Pesticides above the limit of quantification present in each sample, arranged by collecting points and dates. 159

Tabela 4. PCA results for groundwater set.	160
Tabela 5. Classification functions and matrix for stepwise discriminant analysis of collecting points variation.	161
 Capítulo 7. Groundwater from Infiltration Galleries Used for Small Public Water Supply Systems: Contamination with Pesticides and Endocrine Disruptors.	
Tabela 1. Infiltration galleries (fountains for public supply) sampling location data.	169
Tabela 2. Method validation data. Calibration parameters and related uncertainties.	170
Tabela 3. Results obtained in the analysis of estrogens and pesticides from different chemical families (some of them with endocrine disrupting properties) in waters from infiltration galleries used for small public water supply systems in small villages in the North of Portugal.	171
 Capítulo 9. Avaliação da exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas através da ingestão de vegetais crus, produzidos em estufa.	
Tabela 1: Dados do ajuste linear de dissipação para os compostos <i>folpet</i> e <i>fenhexamid</i> em alface, com os valores (R_0) correspondentes aos níveis de resíduos iniciais (mg/kg), o tempo de semi-vida para o resíduo de pesticida ($t_{1/2}$) (dias) e o tempo necessário para atingir o LMR (t_{MLR}) (dias) para os dois fungicidas estudados.	203

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Nomes
ADI	Dose diária aceitável
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Detetores de ionização a pressão atmosférica
ARfD	Dose aguda de referência
ASE	Accelerated Solvent Extraction
CCD	Central Composite Design
CE	Eletroforese capilar
CEE	Comunidade Económica Europeia
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV%	Coeficiente de variação
CW/TPR	Carbowax/Templated Resin
DAD	Detenção por díodos
DDT	Tricloro 2,2-BIS (4-clorofenil)etano
DL ₅₀	Dose letal média
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
DVB	Divinilbenzeno
ECD	Detetor de captura de electrões
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EI	Ionização por impacto electrónico
ELCD	Detetor de condutividade electrolítica líquido
ESI	Ionização por electrospray
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FPD	Detetor fotométrico de chama
GC	Cromatografia gasosa
GCB	Carvão activado
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HF-LPME	Hollow fiber liquid-phase microextraction

Abreviatura	Nomes
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	International Conference on Harmonization
INAG	Instituto da Água
INE	Instituto Nacional de Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol/água
LC	Cromatografia líquida
LC ₅₀	Inalação aguda letal
LD	Limite de detenção
LLE	Extração líquido-líquido
LMR	Limite máximo de resíduo
LQ	Limite de quantificação
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MS	Espectrometria de massa
MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida
NDPE	2-nitrophenyl ether
-NH ₂	Aminopropil
NOAEL	Efeito adverso não observado
NOEL	Ausência de efeitos observáveis
NPA	4-nitrophenyl acetate
NPD	Detetor de ionização de chama alcalina
NPD	Detetor de fósforo e azoto
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetililoxano
PEC	Concentração previsível no ambiente
PI	Padrão interno
PLE	Extração líquida pressurizada
PNA	Plano Nacional da Água
PSA	Amina primária e secundária
PTV	Temperatura programada de vaporização

Abreviatura Nomes

QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
RSD	Desvio padrão relativo
RSM	Metodologia de superfície de resposta
SANCO	Directorate General for Health & Consumers - European Commission
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SDME	Single drop microextraction
SFE	Extração por fluidos supercríticos
SIM	Monitorização de iões seleccionados
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TER	Taxa de exposição à toxidade
TOF	Time of flight
UE	União Europeia

Enquadramento geral, objetivos e organização da dissertação

Os produtos fitofarmacêuticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com capacidade inerente para matar ou controlar organismos prejudiciais ou indesejados. São substâncias usadas na agricultura, que contribuem para aumentar e melhorar a produção de alimentos, ou ainda por razões de saúde pública, nomeadamente para travar a disseminação de doenças através do controlo de vetores. São vulgarmente classificados de acordo com os alvos a que se destinam, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, entre outros.

Durante muitos anos, todos estes produtos foram designados por pesticidas, termo quase sempre associado a uma certa conotação negativa, e que continua a ser muito usado nas terminologias inglesa e francesa. No entanto, em Portugal, o termo pesticida surge, atualmente, atribuído à ideia de resíduo, usando-se a designação resíduos de pesticidas e não resíduos de produtos fitofarmacêuticos. Deste modo, ao longo da dissertação, adotar-se-ão as designações de produto fitofarmacêutico para os compostos e de pesticida para os resíduos resultantes da sua utilização.

A aplicação de produtos fitofarmacêuticos na agricultura data de aproximadamente 500 a.C. No entanto, a sua grande expansão ocorreu apenas após a 2ª Guerra Mundial, devido à descoberta e amplo desenvolvimento de compostos orgânicos com grande atividade inseticida ou herbicida. A sua fácil aplicação, o apoio eficiente dos técnicos das empresas que os comercializavam e as evidentes vantagens agrícolas e económicas justificaram a grande expansão destes produtos a partir das décadas de 50, 60 e 70. Assim, torna-se indiscutível a relação entre o aumento da sua aplicação na agricultura e o incremento da esperança média de vida do Homem, os seus padrões de saúde e prosperidade, que é superior a qualquer outra época da história humana.

No entanto, a utilização de muitos dos produtos fitofarmacêuticos envolve efeitos negativos, quer para o meio ambiente, quer para a vida do Homem e dos animais. A avaliação de risco destas substâncias torna-se, assim, prioritária, requerendo rigorosas informações sobre as suas propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas, assim como, todos os dados relacionados com os níveis residuais nos alimentos e no ambiente.

A exposição a compostos fitofarmacêuticos envolve, maioritariamente, efeitos crónicos, suscetíveis de comprometer a saúde das populações expostas, associados a processos de bioacumulação e persistência ambiental, carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, bem como a efeitos adversos nos sistemas imunitário ou endócrino. Existem igualmente riscos para o ambiente resultantes da disseminação não controlada de produtos fitofarmacêuticos por efeito da lixiviação ou escoamento dessas substâncias,

causando a poluição do solo e das águas. Consequentemente, o seu uso deve ser cuidadosamente controlado e os resíduos monitorizados, com o intuito de maximizar os benefícios e minimizar os efeitos prejudiciais.

Na prática, é extremamente difícil quantificar os verdadeiros efeitos indesejáveis da utilização de produtos fitofarmacêuticos, o que ocasionou, nos últimos anos, um agravamento da preocupação dos consumidores relativamente à segurança alimentar e ambiental, verificando-se, concomitantemente, um aumento das restrições legais.

O Regulamento (UE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas nos produtos de origem vegetal e animal define um novo e totalmente harmonizado conjunto de regras para resíduos de pesticidas. Adicionalmente, quase todos os países têm, a nível governamental, programas de monitorização que avaliam as quantidades de resíduos de pesticidas em frutas, legumes, grãos, carnes e aves, frutos do mar, bebidas, ovos, nozes, tabaco, e outros tipos de produtos agrícolas.

As crescentes imposições legais implicam, necessariamente, a utilização de métodos analíticos sensíveis e fiáveis destinados a permitir a monitorização dos resíduos de pesticidas nas matrizes designadas.

A pesquisa de níveis vestigiais de pesticidas nos alimentos requer, primeiramente, cuidadosos e rigorosos procedimentos de extração e purificação destinados a remover interferências de elevado peso molecular, tais como lípidos e proteínas, antes de se efetuar a análise, geralmente pela aplicação das técnicas de cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta performance. Atendendo à diversidade de matrizes suscetíveis de conter pesticidas e aos níveis vestigiais em que estes compostos se encontram presentes, o processo extrativo é, então, o primeiro e principal fator limitante na análise de resíduos de pesticidas. No entanto, não é suficiente dispor de um método analítico apropriado, sendo igualmente necessária a realização de um cuidadoso planeamento experimental e uma adequada colheita das amostras para que se obtenham resultados representativos e estatisticamente comparáveis.

A garantia da redução dos riscos resultantes da utilização de produtos fitofarmacêuticos, principalmente em zonas de agricultura intensiva, em que os agricultores tendem a utilizar uma grande variedade de produtos a fim de aumentar a produtividade e reduzir as perdas nas colheitas, implica avaliar o cumprimento das boas práticas agrícolas e rigoroso respeito dos “intervalos de segurança”. Estas características são específicas para cada composto e representam o número de dias, variável de acordo com o produto fitofarmacêutico utilizado e o produto agrícola a proteger, durante os quais o alimento não pode ser colhido após o tratamento.

Em relação ao papel da dieta na exposição humana, supõe-se que a ingestão continuada de alimentos contendo níveis vestigiais de pesticidas pode causar danos no organismo, especialmente em grupos de risco, tais como as crianças, os idosos e os doentes crónicos. Neste contexto, é importante avaliar se os LMR estão a ser cumpridos, até porque vários dos pesticidas usados fazem parte da lista dos prováveis “Disruptores Endócrinos”. Estes compostos são capazes de desequilibrar o sistema endócrino, causando alterações comportamentais, anomalias na função reprodutiva (criptorquidia, hipospadia, alteração qualidade do sêmen) e certos tipos de cancro de influência hormonal.

Outro aspeto, que não deve ser descurado, é o facto de as atividades agrícolas exercerem grande influência na qualidade das águas subterrâneas, devido à possibilidade de causar contaminação difusa, não só por ação de nitratos, mas também por pesticidas, especialmente em áreas onde os solos são pouco espessos e possuem boa drenagem. O conhecimento da qualidade das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva e o impacto das práticas agrícolas realizadas é também um precioso contributo para a redução dos riscos inerentes à utilização de produtos fitofarmacêuticos.

Objetivos

Os objetivos globais desta dissertação incluem: *(i)* otimização e validação de novas metodologias analíticas, para análise de resíduos de pesticidas em água e vegetais, recorrendo a processos de extração/purificação com baixo consumo de reagentes e utilizando técnicas cromatográficas fiáveis e precisas acopladas a detetores vulgarmente disponíveis em laboratórios de controlo de qualidade; *(ii)* avaliação do grau de contaminação de alimentos tratados com produtos fitofarmacêuticos, nomeadamente alguns vegetais produzidos em estufa, aplicando as metodologias analíticas validadas. Avaliação da exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas, através de estudos da evolução da dissipação dos pesticidas durante o intervalo de segurança e análise de vegetais disponíveis no mercado; *(iii)* aplicação das metodologias validadas para avaliação do impacto ambiental decorrente da aplicação de produtos fitofarmacêuticos, através da análise da contaminação de águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva.

A concretização do primeiro objetivo global, mencionado anteriormente, foi conseguida estabelecendo os seguintes objetivos específicos:

- desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia multirresíduo, com base num processo de extração em fase sólida, seguido de análise por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (SPE-GC/MS), para deteção e quantificação de níveis vestigiais de trinta e dois compostos, aplicando um modelo de regressão linear ponderada na calibração analítica. Esta metodologia é destinada à análise de matrizes de águas subterrâneas;
- desenvolvimento, otimização e validação de um método de microextração em fase sólida associado a cromatografia líquida de alta performance e deteção por díodos (SPME-HPLC/DAD), para a avaliação de pesticidas vulgarmente usados na produção de alface (*Lactuca sativa*). Otimização das variáveis inerentes à microextração em fase sólida por recurso a uma metodologia de curvas de superfície de resposta, baseada num “*central composite design*”;
- desenvolvimento de um novo método de preparação de amostras englobando a técnica de extração de QuEChERS (acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e um processo de microextração líquido-líquido dispersiva para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de tomate (QuEChERS/DLLME - HPLC/DAD). A purificação da amostra é especialmente relevante neste processo, baseando-se a otimização das variáveis num desenho experimental designado por “*central composite design*”;
- desenvolvimento, otimização e validação de um outro método multirresíduo para monitorização de resíduos de pesticidas em amostras de tomate, com purificação das amostras através da combinação da extração com acetonitrilo seguida de DLLME, de forma a permitir elevados fatores de enriquecimento, e posterior análise por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (QuEChERS/DLLME-GC/MS).

A concretização do segundo objetivo global, mencionado anteriormente, abrangeu os seguintes objetivos específicos:

- aplicação do método multirresíduo SPME-HPLC/DAD para a monitorização de pesticidas em amostras de alface produzidas em estufa, com o intuito de estudar o comportamento da dissipação de alguns destes pesticidas durante o intervalo de segurança;
- aplicação do método multirresíduo QuEChERS /DLLME-GC/MS para monitorização de resíduos de pesticidas em amostras de tomate produzido em estufa durante o inverno.

A concretização do terceiro objetivo global, mencionado anteriormente, foi conseguida estabelecendo os seguintes objetivos específicos:

- aplicação da metodologia multirresíduo SPE-GC/MS para avaliar o impacto das práticas de horticultura intensiva na poluição das águas subterrâneas de uma Zona Vulnerável, através da monitorização das concentrações de nitratos, nitritos, sódio, potássio e pesticidas, na água de poços e furos, durante um ano;
- aplicação da metodologia multirresíduo SPE-GC/MS para avaliar a qualidade das águas provenientes de minas, colhidas em fontes de abastecimento público, localizadas em pequenas aldeias localizadas numa zona dedicada à cultura da vinha.

Organização da dissertação

Esta dissertação foi dividida em quatro partes, com um total de 11 Capítulos.

A Parte I inclui o Capítulo 1 dedicado à introdução teórica da dissertação. Neste capítulo descrevem-se os conceitos e classes dos produtos fitofarmacêuticos, vantagens e desvantagens decorrentes da sua utilização, os riscos que envolvem para o homem e para o ambiente, assim como o desenvolvimento de diferentes metodologias analíticas baseadas em técnicas cromatográficas para a deteção de níveis vestigiais de resíduos de pesticidas em diferentes matrizes, tais como, a água e duas espécies de vegetais.

A Parte II inclui os Capítulos 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Nesta parte são apresentados os artigos científicos publicados ou submetidos para publicação no âmbito desta dissertação descrevendo, deste modo, todo o trabalho experimental realizado. Nesses trabalhos foram exploradas e desenvolvidas diferentes metodologias de extração com o intuito de implementar novos procedimentos analíticos, nomeadamente: extração em fase sólida, microextração em fase sólida, QuEChERS e microextração líquido-líquido dispersiva. Estas metodologias funcionaram como estratégias inovadoras face às diferentes situações descritas na literatura, sendo acopladas posteriormente a técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia líquida de alta performance e deteção por díodos ou a cromatografia gasosa com espectrometria de massa.

As estratégias de validação analítica descritas nos Capítulos 2, 3, 4, e 5 basearam-se em diferentes modelos estatísticos, tais como a calibração com aplicação de um modelo de regressão linear ponderada ou a metodologias de curvas de superfície de resposta.

Posteriormente, procedeu-se à aplicação dos métodos desenvolvidos para monitorização da contaminação de vegetais por resíduos de pesticidas (Capítulos 3 e 5) e monitorização de diferentes amostras de águas subterrâneas provenientes de zonas de agricultura intensiva, incluindo horticultura (Capítulo 6) e cultura da vinha (Capítulo 7).

A Parte III inclui a discussão global dos resultados obtidos na parte experimental. No Capítulo 8 apresenta-se a discussão dos resultados obtidos na validação das diferentes metodologias analíticas aplicadas à análise de amostras de vegetais e de água. O Capítulo 9 descreve os resultados obtidos nos estudos da evolução da dissipação dos pesticidas em amostras de alface durante o intervalo de segurança e na análise de amostras de tomate produzido em estufas durante o inverno. O Capítulo 10 apresenta a discussão dos resultados obtidos na avaliação do impacto das práticas agrícolas na qualidade das águas subterrâneas, nomeadamente, o impacto da horticultura intensiva na poluição das águas subterrâneas de uma zona vulnerável, e na qualidade das águas subterrâneas provenientes de uma zona dedicada à cultura da vinha.

Na Parte IV, o Capítulo 11 resume as conclusões globais da dissertação.

Artigos publicados ou submetidos, em revistas internacionais indexadas, no âmbito desta dissertação

C. Mansilha, A. Melo, H. Rebelo, I.M.P.L.V.O.Ferreira, O. Pinho, V. Domingues, C. Pinho, P. Gameiro (2010) Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *J. Chromatogr. A*, 1217 (43), 6681-6691.

C. Mansilha, A. Melo, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho, V. Domingues, C. Pinho, P. Gameiro (2011). Groundwater from Infiltration Galleries Used for Small Public Water Supply Systems: Contamination with Pesticides and Endocrine Disruptors. *B. Environ Contam Toxicol*, 87, 3, 312-318.

A. Melo, A. Aguiar, C. Mansilha, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira. (2012) Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce. *Food Chem.* 130 (4), 1090-1097.

A. Melo, E. Pinto, A. Aguiar, C. Mansilha, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira. Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-011-2283-4

A. Aguiar, A. Melo, C. Mansilha, I.M.P.L.V.O. Ferreira. Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality. *Acta Horticulturae* (in press)

A. Melo, C. Mansilha, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira. Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography (submetido)

A. Melo, S.C. Cunha, C. Mansilha, A. Aguiar, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry (submetido)

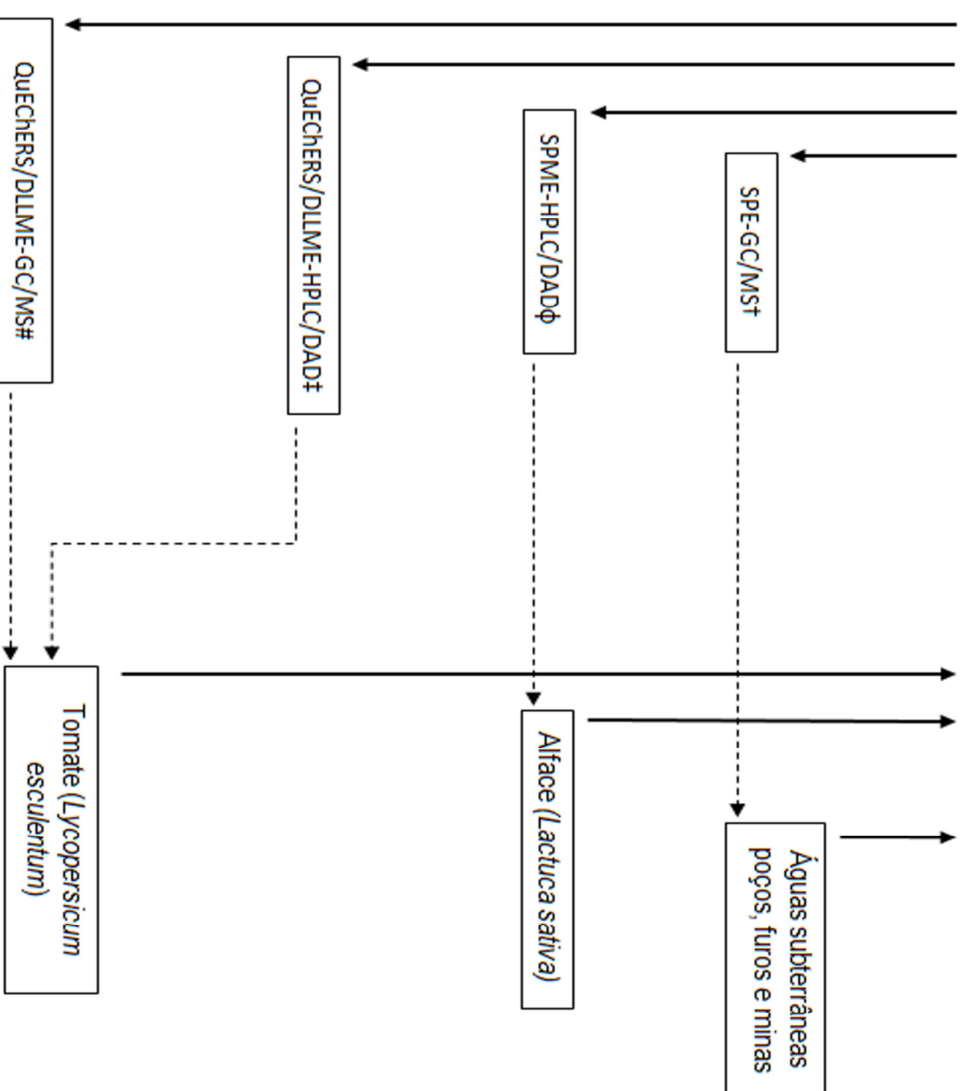
OBJETIVOS

Otimização e validação de metodologias analíticas multirresíduo para análise de níveis vestigiais de pesticidas em água e vegetais

Exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas através da ingestão de vegetais crus, produzidos em estufa

Contaminação das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva

Herbicidas	Inseticidas	Fungicidas
EPTC [†] Atrazine [†] Atrazine-desethyl [†] Terbutylazine [†] Terbutylazine-desethyl [†] Linuron [†] Alachlor [†] S-Metolachlor [†] Pendimethaline [†] 2,4-D [†] Atrazine ^{†#} Bentazone [‡] Tembotrione [‡] Diuron [‡] Dicamba [‡] Foransulfuron [‡] Mesotrione [‡]	Phosmet [†] Dimethoate [†] Aldrin [†] Dieldrin [†] Endrin [†] o,p-DDT [†] Methoxychlor [†] Acetamiprid ^{†#} Pirimicarb ^{†#} Thiamethoxam ^{†#} Cyromazine ^{†#} Deltamethin [‡] Methomyl [‡] Ethoprophos [‡] Tefluthin [‡] Chlorpyrifos [‡] Chlorpyrifos-methyl [‡] Bifenthrin [‡] Cyhalothrin [‡] Endosulfan [‡]	Metalaxyl ^{†#} Cyprodinil ^{†#} Tolyfluanid ^{†#} Fludioxonil ^{†#} Fenhexamid ^{†#} Azoxystrobin ^{†#} Folpet ^{†#} Iprodione ^{†#} Cymoxanil [‡] Pyraclostrobin [‡] Matalaxyl M [‡] Chlorothalonil [‡] Vinclozolin [‡] Kresoxim-methyl [‡] Trifloxystrobin [‡] Tebuconazole [‡] Dimoxystrobin [‡] Dichlofluanid [‡] Tetraconazole [‡] Difenoconazol [‡] Captan [‡] A-cyhalothrin [‡] Picoxystrobin [‡]



PARTE I

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

As atividades decorrentes do uso do solo transformaram uma grande percentagem da superfície terrestre. Campos agrícolas e pastagens tornaram-se numa das maiores biomassas do planeta e ocupam 40% da superfície terrestre, rivalizando em extensão com a cobertura florestal (1). A alteração das práticas agrícolas conduziu à duplicação da produção mundial de cereais nas últimas quatro décadas, ultrapassando, neste momento, dois biliões de toneladas por ano. Este facto deveu-se principalmente a dois fatores: aumento de ~12% da área cultivada e novas tecnologias implementadas com a “revolução verde”, nomeadamente a adoção de um sistema de produção intensiva que inclui cultivares de alto rendimento, fertilizantes químicos e fitofármacos, da mecanização e irrigação (2). Neste contexto, os produtos fitofarmacêuticos são um dos componentes mais importantes para a agricultura mundial (3).

O uso de produtos fitofarmacêuticos para matar ou controlar pragas não é um conceito novo. Diversos compostos inorgânicos naturais com propriedades tóxicas foram utilizados pelo Homem como fitofármacos desde a antiguidade (4). Os romanos utilizavam o sal para impedir o crescimento das ervas daninhas nas suas estradas e os gregos fumigavam as suas casas com enxofre. No século XVI os chineses usavam o sulfureto de arsénio como um inseticida. O uso de compostos á base de arsénio prosseguiu e, durante a primeira metade do século XX, grandes quantidades de compostos como o arseniato de chumbo foram utilizados para controlar pragas de insetos (3-5).

Alguns fitofármacos inorgânicos são relativamente estáveis, apresentando um tempo de semi-vida superior a muitos produtos fitofarmacêuticos orgânicos produzidos na atualidade. A persistência dos fitofármacos inorgânicos, embora vantajosa no que respeita ao controlo de pragas, significa igualmente a persistência da substância ativa nas espécies tratadas e no ambiente por vários anos (5).

A era dos produtos fitofarmacêuticos orgânicos sintéticos teve início por volta de 1940, e expandiu-se rapidamente pois, atendendo a que estes produtos químicos apresentavam um controlo muito eficaz de pragas, a sua adoção foi extremamente rápida. Deste modo, novos produtos químicos foram desenvolvidos e usados como fitofármacos (3). O composto denominado 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, ou DDT, de fórmula molecular $C_{14}H_9Cl_5$, foi o primeiro produto fitofarmacêutico moderno e um dos compostos mais relevantes produzidos na história da Humanidade, tanto pelos seus efeitos benéficos quanto maléficos, tendo sido largamente usado após a Segunda Guerra Mundial para o combate aos mosquitos vetores da malária e da febre tifóide. O DDT é, no

entanto, um poluente orgânico persistente, cancerígeno e comprovadamente disruptor endócrino, tendo sido proibido a sua utilização (6).

Os produtos fitofarmacêuticos sintéticos têm desempenhado um papel importante na alimentação humana e animal, produção de fibras, bem como em saúde pública e qualidade ambiental. Os fitofarmacos mais tóxicos e/ou persistentes estão atualmente a ser substituídos por fitofármacos mais ecológicos, com baixa dose de princípio ativo e reduzido risco para os seres humanos e organismos não-alvo (6).

1.1. Conceitos e classes de pesticidas

A definição proposta pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) estabelece que produto fitofarmacêutico é “qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doença humana ou animal, as espécies não desejadas de plantas ou animais que causam danos ou interferindo com a produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos à base de madeira, alimentos para animais, ou substâncias que podem ser administrados em animais para o controlo de insetos, aracnídeos ou outras pragas. O termo inclui substâncias destinadas para uso, como um regulador de crescimento da planta, desfolhantes, dessecantes, ou o agente para o desbaste de frutos ou prevenir a queda prematura de frutos, e as substâncias aplicadas a culturas, quer antes ou depois da colheita, para proteger o produto de degradação durante o armazenamento e transporte” (7). Contudo, em geral, pode ser definido como uma substância que exerce ação tóxica sobre uma determinada praga, que pode prejudicar ou ser um vetor de doenças para o Homem (3).

Existem diversos tipos de produtos fitofarmacêuticos que se classificam de acordo com as pragas que têm por fim combater, tal como exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1: Tipos de produtos fitofarmacêuticos classificados de acordo com o efeito desejado.

Produtos	Efeito
Fitofarmacêuticos	
Herbicidas	Combatem ervas daninhas e outras plantas infestantes
Inseticidas	Combatem insetos e outros artrópodes
Fungicidas	Combatem fungos
Acaricidas	Combatem ácaros
Nematodocidas	Combatem nematóides parasitas
Moluscicidas	Combatem moluscos (lesmas e caracóis)
Rodenticidas	Combatem ratos e roedores em geral
Algicidas	Combatem algas
Bactericidas	Combatem bactérias
Feromonas	Permitem o reconhecimento mútuo e sexual dos indivíduos da mesma espécie
Reguladores de Crescimento	Interferem com os processos fisiológicos das plantas

A classificação dos produtos fitofarmacêuticos acima mencionada é uma classificação básica concordante com o objetivo biológico a que se propõem. Devido à grande diversidade de fitofármacos, torna-se difícil elaborar um esquema geral de classificação. No entanto, estes compostos poderão ser classificados com base na sua origem, o modo de ação, natureza química, e as espécies alvo. A Figura 1 apresenta uma categorização esquemática de fitofármacos em diferentes classes.

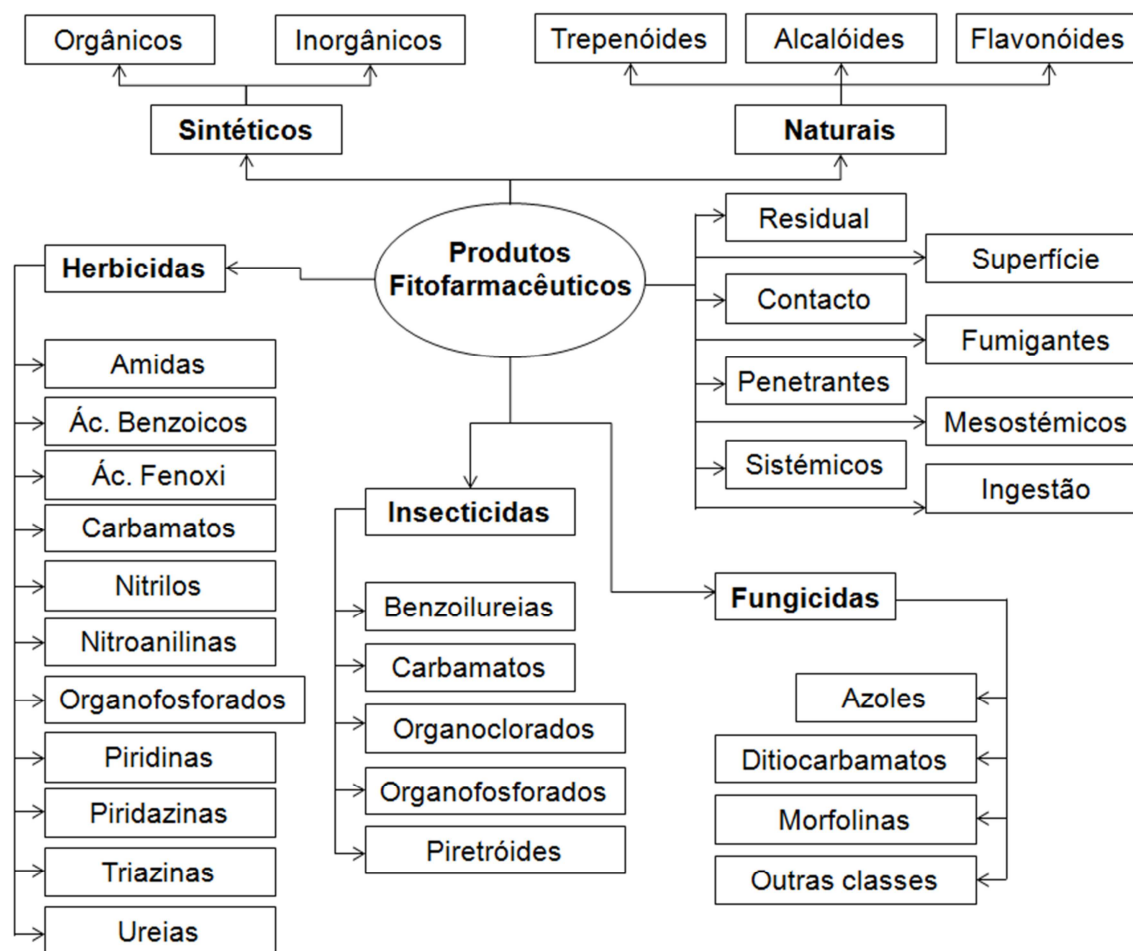


Figura 1: Representação esquemática da classificação dos fitofármacos com base na sua origem, modo de ação, natureza química, e as espécies alvo (3, 8).

Hoje em dia, uma vasta gama de produtos fitofarmacêuticos tem sido sintetizada, formulada e testada quanto à sua eficácia contra várias espécies alvo (9). São normalmente substâncias químicas embora, por vezes, também incluam agentes biológicos, tais como vírus ou bactérias. A porção ativa de um produto fitofarmacêutico, conhecida como substância ativa, é geralmente formulada sob a forma de concentrados emulsionáveis ou em partículas sólidas (pó, grânulos, pó solúvel, ou pó molhável). Muitas formulações comerciais têm de ser diluídas com água antes de serem aplicadas, podendo também conter adjuvantes para melhorar a retenção dos produtos e absorção pelas folhas ou rebentos (8).

Produtos fitofarmacêuticos bem-sucedidos são produzidos em quantidades maciças para utilização em todo o mundo, podendo representar aproximadamente 4,5% dos custos totais da produção agrícola (9). Quando os produtos fitofarmacêuticos são quantificados em termos económicos, os herbicidas dominam o mercado, seguidos pelos inseticidas e fungicidas, como se pode observar pela análise da Figura 2(10, 11).

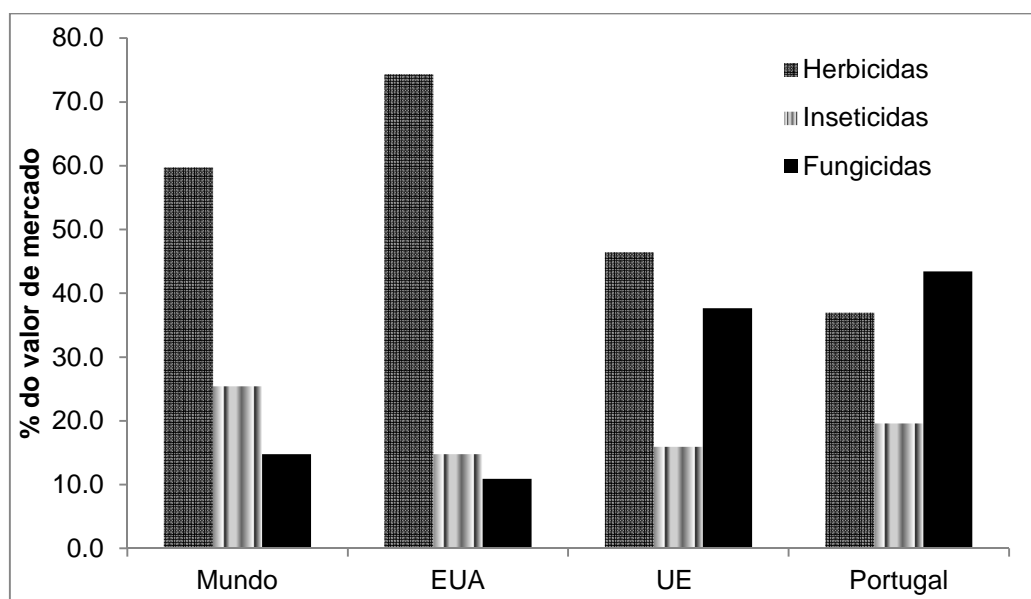


Figura 2: Distribuição do mercado dos produtos fitofarmacêuticos expressa em percentagem de valor monetário (%) por tipo de fitofármaco em 2009 (10, 11)

A quantidade de pesticidas aplicados numa determinada área geográfica depende das pragas, doenças ou infestante que se pretende controlar, bem como das culturas e condições climáticas verificadas em cada ano (8).

1.2. Vantagens da utilização de produtos fitofarmacêuticos

À semelhança de muitas inovações tecnológicas, que ao longo do tempo têm contribuído para uma melhor qualidade de vida, também os produtos fitofarmacêuticos exibem reconhecidas vantagens podendo, no entanto, representar igualmente um risco se não forem utilizados criteriosamente. Facilmente se reconhecem outros exemplos no nosso quotidiano, tais como a produção de eletricidade ou os medicamentos, que associados aos benefícios notórios, acarretam alguns aspetos negativos. Também os produtos fitofarmacêuticos, vistos como inovações que melhoram claramente a vida do Homem, devem ser regulamentados e utilizados de modo a que os benefícios superem largamente os riscos (12).

Um dos benefícios óbvios subsequente do uso de fitofármacos é o aumento da produção agrícola mundial, sendo amplamente reconhecido o facto dos fitofármacos serem um dos componentes mais importantes da tecnologia agrícola moderna. Um terço das perdas agrícolas em todo o mundo resulta da ação de organismos prejudiciais. Cerca de 70.000 espécies de insetos e ácaros podem atacar todas as partes das plantas agrícolas durante o período de vegetação e armazenamento (3). No entanto, apesar de alguns avanços conseguidos no controle biológico e no desenvolvimento de resistências das plantas a determinadas pragas, os agricultores continuam a não ter alternativa à utilização de fitofármacos de forma a reduzir as suas perdas (8). Estima-se que a não utilização destes compostos conduziria à perda de um terço da produção agrícola mundial (3, 8). Este benefício é particularmente importante em países em vias de desenvolvimento, onde as pragas causariam elevados prejuízos financeiros ao erário público e as perdas agrícolas pós-colheita contribuiriam para a fome e a desnutrição, em milhões de adultos e crianças (12).

Associado ao benefício evidente de redução da perda de colheitas resultante da utilização de produtos fitofarmacêuticos, existe uma vasta gama de outras vantagens para o ser humano, menos óbvias, porque ocorrem a médio ou longo prazo, mais subtis, ou porque constituem pequenos benefícios incrementais distribuídos sobre uma grande área. De forma a facilitar uma análise sistemática capaz de desvendar os potenciais benefícios da utilização de produtos fitofarmacêuticos, efetuou-se a sua enumeração hierárquica. Foram designados, como benefícios primários, as vantagens diretas, e benefícios secundários, as vantagens que ocorrem a médio ou longo prazo.

É de realçar que os efeitos dos produtos fitofarmacêuticos são as consequências imediatas resultantes da sua utilização, por exemplo, o de matar lagartas numa couve. Estes efeitos não são classificados como benefícios. Benefícios são as consequências dos efeitos produzidos. O efeito de matar lagartas nas couves impede que estas se

alimentem, trazendo como benefício principal um rendimento mais elevado e uma melhor qualidade da couve.

Em suma, os três principais efeitos dos produtos fitofarmacêuticos são:

- (i) o controlo de pragas agrícolas e vetores de doenças de plantas;
- (ii) o controlo de vetores de doenças humanas e animais e organismos incómodos;
- (iii) a prevenção ou controlo dos organismos que prejudicam as atividades humanas.

Tabela 2: Representação dos benefícios primários e secundários, decorrentes da utilização dos produtos fitofarmacêuticos (12).

Principais efeitos dos pesticidas	Benefícios primários		Benefícios secundários	
	Controlo de pragas e vetores de doenças em plantas	<ul style="list-style-type: none">- Aumento dos rendimentos das culturas e pecuária- Aumento da qualidade das culturas e pecuária- Redução das toxinas fúngicas- Aumento da validade de produtos perecíveis- Estabelecimento de redes de revendedores- Redução do trabalho excessivo para remoção de ervas daninhas- Redução no consumo de combustíveis para remoção de ervas daninhas- Redução da perturbação do solo- Pragas contidas geograficamente- Controlo de espécies invasoras	Maiores receitas da agricultura e do agronegócio <ul style="list-style-type: none">- Melhor nutrição e saúde- Segurança alimentar- Qualidade de vida melhorada- Maior gama de culturas viável- Tempo de trabalho libertado para outras tarefas- Aumento da expectativa de vida- Redução de tratamentos e custos médicos- Servir a população- Redução do stress- Redução dos custos de manutenção	Benefícios para a comunidade
	Controlo de vetores de doenças em Homens e Animais	<ul style="list-style-type: none">- Vidas humanas salvas- Redução do sofrimento humano- Perturbação humana reduzida- Vidas animais salvas- Redução do sofrimento animal- Aumento dos rendimentos da pecuária- Aumento da qualidade dos animais da pecuária- Doenças contidas geograficamente	<ul style="list-style-type: none">- Melhora a economia agrícola nacional- Aumento das receitas de exportação- Aumento da produtividade da força de trabalho- Assessoria agrónómica melhora as colheitas- Redução das perdas do solo em termos de erosão e humidade- Redução da migração para as cidades- Áreas urbanas mais agradáveis- Menos acidentes de transporte	Benefícios nacionais
	Prevenir ou controlar organismos que possam prejudicar atividades ou estruturas humanas	<ul style="list-style-type: none">- Prevenção de riscos para árvores/arbustos/folhas- Prevenção do dano pela humidade de raízes- Plantas de jardim protegidas- Proteção de ornamentos públicos- Proteção de estruturas de madeira- Proteção de alvenaria, tintas, plásticos etc.	Asseguradas a variedade e qualidade dos géneros agrícolas <ul style="list-style-type: none">- Redução da agitação civil- Menor pressão sobre as áreas não cultivadas- Menor emissão de gases estufa- Menor introdução de pragas em outras partes do mundo- Maiores receitas do turismo internacional- Aumento das áreas habitáveis- Conservação da biodiversidade- Menor propagação de doenças a nível internacional- Maior número de árvores reduz o aquecimento global	Benefícios globais

Os benefícios primários estão representados como os ganhos diretos esperados da utilização dos produtos fitofarmacêuticos. Estes são os principais benefícios resultantes da respetiva atuação. Dos três efeitos listados anteriormente, os principais benefícios identificados vão desde a simples proteção de um relvado de lazer até à redução do sofrimento humano. Enquanto os benefícios secundários são os menos imediatos, e as suas consequências menos intuitivas e óbvias, porque só se manifestam a médio/longo prazo. Para os benefícios secundários, é mais difícil estabelecer uma relação de causa-efeito, no entanto, podem igualmente, constituir justificações poderosas para a utilização de produtos fitofarmacêuticos. Por exemplo, o maior rendimento obtido na produção da couve pode trazer rendimentos adicionais aos produtores que, por seu lado, os poderão utilizar na educação dos filhos ou em melhores cuidados médicos, levando a uma população mais saudável e com formação diferenciada. Embora possam existir diferentes interações entre os efeitos benéficos, estas são geralmente complexas. É importante reconhecer que existem muitas e variadas implicações positivas decorrentes da utilização de fitofármacos, algumas mais óbvias e outras nem tanto. Embora tenha havido uma simplificação inevitável neste processo de classificação, é evidente que os benefícios são muitos e diferentes e podem operar em diferentes domínios e dimensões, e em todos os países (12).

Existem muitas outras tecnologias que quando utilizadas em paralelo com os produtos fitofarmacêuticos podem potenciar estes benefícios, desde que os riscos associados sejam devidamente geridos. No entanto, para maximizar os benefícios da utilização de produtos fitofarmacêuticos com um custo mínimo, quer para o Homem, quer para o ambiente ou mesmo para a economia, os fitofármacos devem ser cuidadosamente regulamentados e usados criteriosamente por pessoal devidamente treinado e devidamente equipado, de preferência em estreita integração com outras tecnologias complementares.

1.3. Desvantagens da utilização de produtos fitofarmacêuticos

É cada vez mais indissociável a utilização de produtos fitofarmacêuticos e a problemática ambiental e de saúde pública relacionada com os efeitos nocivos do seu uso, no que concerne a riscos para a saúde humana e animal e efeitos nefastos no meio ambiente.

Os fitofármacos são venenos e são produzidos para serem tóxicos para uma ou várias formas de vida. O uso frequente de produtos fitofarmacêuticos favorece os riscos de contaminação do meio ambiente, nomeadamente, a contaminação de solos agrícolas, de águas superficiais e subterrâneas e de alimentos podendo, em episódios mais graves, inviabilizar o seu consumo (9).

Inicialmente, o aumento da utilização destes compostos foi considerado um sinal positivo do progresso agrícola. Posteriormente, o Homem apercebeu-se que cada composto adicionado ao ambiente só demonstrava os seus efeitos indesejados ou tóxicos muito mais tarde, sendo este facto evidenciado, principalmente, nos produtos fitofarmacêuticos organoclorados persistentes, como o DDT. É de realçar que este tipo de compostos não possui uma toxicidade aguda muito elevada para humanos ou animais não artrópodes, mas causa graves efeitos prejudiciais ao ecossistema, tais como os descritos por Rachel Carson no livro “Silent Spring” de 1962.

Muitos dos produtos fitofarmacêuticos organoclorados persistentes foram mundialmente banidos a partir da década de 70 (o DDT é exceção, sendo que ainda hoje pode ser utilizado em alguns países tropicais no combate da malária). Atualmente continua a ser comum a sua deteção e quantificação, em níveis muito baixos, em humanos, vida selvagem, no meio ambiente, bem como, nalgumas cadeias alimentares devido ao seu longo tempo de persistência (13).

Os princípios ativos dos fitofármacos podem movimentar-se no meio ambiente através do ar, solo e água, acabando por chegar às cadeias tróficas superiores. Verifica-se, deste modo, bioacumulação nos tecidos corporais de diferentes organismos, podendo atingir concentrações muito superiores às encontradas no meio ambiente envolvente (14). Consequentemente, tem-se verificado deterioração de ecossistemas pelo uso contínuo de produtos fitofarmacêuticos, tal como esquematizado na Figura 3 (3). Constata-se também, cada vez com maior frequência, situações de envenenamento por fitofármacos de espécies não-alvo, (mortalidade em peixes, insuficiência reprodutiva em aves, e doenças em seres humanos), cuja descrição é cada vez mais pormenorizada. De facto, foi estimado que menos de 0,1% do princípio ativo aplicado às culturas atingia a praga alvo, o restante entrava no ambiente contaminando solo, água e ar, podendo envenenar ou afetar adversamente os organismos não-alvo expostos (14).

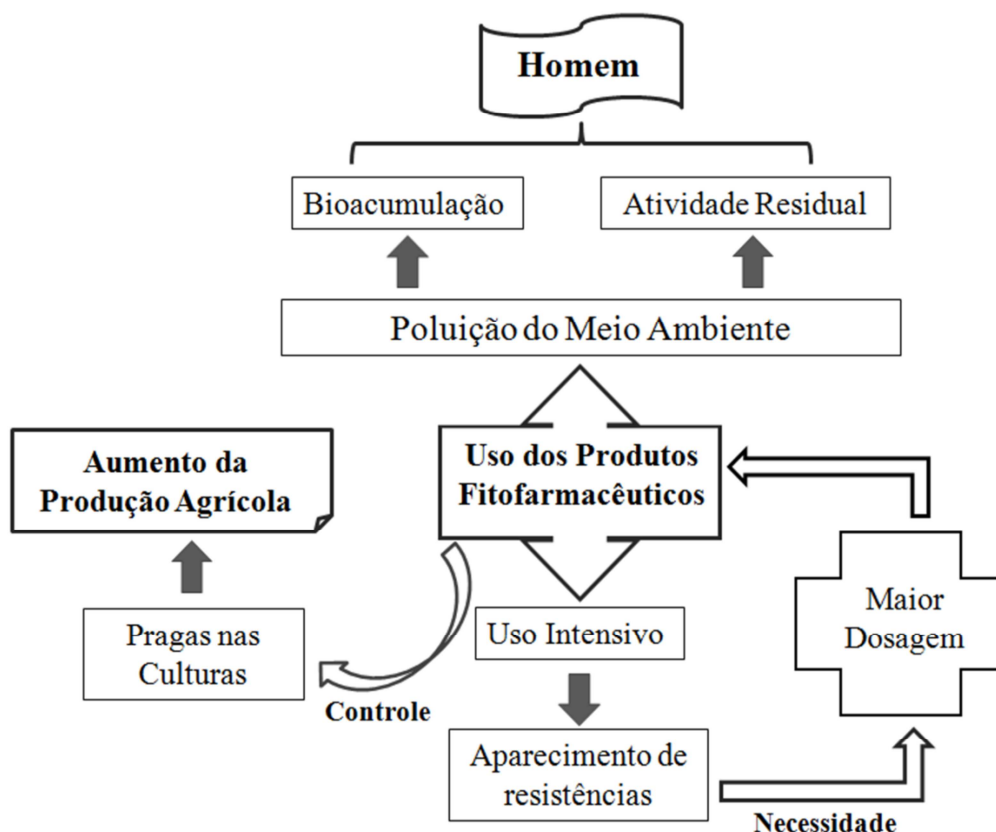


Figura 3: Implicações do uso contínuo de produtos fitofarmacêuticos (3)

A exposição da população aos produtos fitofarmacêuticos ocorre principalmente através da ingestão de alimentos e água contaminada com resíduos de pesticidas. Contudo, existem descritas outras vias de exposição a estes produtos, tais como os casos acidentais ou envenenamentos e a exposição ocupacional (15).

A exposição não ocupacional proveniente da contaminação da água, ar e alimentos com resíduos de pesticidas envolve geralmente doses baixas dos compostos e tem carácter crónico (ou semi-crónico) (16). A toxicidade a curto prazo ou aguda pode ser avaliada através de testes toxicológicos, como nos casos de envenenamento, podendo encontrar-se, por vezes, certas correlações causa-efeito no decurso de estudos epidemiológicos. Quando se avaliam os efeitos a longo prazo ou crónicos, como os que envolvem cancro, redução de faculdades cognitivas, alergias e efeitos no sistema endócrino, a ciência atual está impossibilitada de responder plenamente a todas estas questões. Provavelmente nunca será possível avaliar o verdadeiro risco de resíduos de pesticidas devido ao elevado número de variáveis envolvidas e aos baixos níveis em que estes compostos ocorrem (13).

A preocupação com substâncias ativas que possuem propriedades de disrupção endócrina tem adquirido importância crescente ao longo dos últimos anos. Estes

compostos podem contribuir para efeitos adversos no sistema neuroendócrino, tais como puberdade prematura ou infertilidade, através de mecanismos muito variados e complexos. Embora não sendo fácil a correlação com determinada síndrome podem, no entanto, constituir um dos agentes desencadeadores (17). Os disruptores endócrinos apresentam diversos mecanismos fisiológicos, substituindo as hormonas, bloqueando a sua ação natural, ou ainda aumentando ou diminuindo a quantidade original de hormonas, alterando as funções endócrinas.

A nível ambiental, a fauna é particularmente vulnerável aos efeitos dos resíduos de pesticidas como os disruptores endócrinos. Diferentes efeitos foram detetados em invertebrados, répteis, peixes, aves e mamíferos (18).

Cerca de 105 resíduos de pesticidas foram identificados como disruptores endócrinos e destes, 46% são inseticidas, 21% herbicidas e 31% fungicidas. Alguns deles já foram retirados do mercado mas continuam ainda a ser encontrados no ambiente devido à sua elevada persistência (18).

1.3.1. Riscos da ingestão de resíduos de pesticidas nos alimentos

Os resíduos de pesticidas são substâncias que podem estar presentes nos alimentos, forragens, ou no ambiente, sendo resultantes do uso de produtos fitofarmacêuticos. Os resíduos incluem derivados tais como produtos de degradação, metabolitos, produtos de reação e impurezas que podem ter importância toxicológica (9).

Se as boas práticas agrícolas e de produção forem seguidas, à partida não serão encontrados níveis de resíduos de pesticidas acima dos valores legalmente estipulados. Em teoria, se todos os agricultores seguissem procedimentos adequados, as análises aos alimentos seriam supérfluas. Porém, o que se verifica na realidade é a existência de práticas agrícolas por vezes inadequadas, ou o seu incumprimento, podendo ocorrer violação dos limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas estabelecidos e, consequentemente, riscos para os indivíduos expostos (13).

No Homem, uma avaliação correta dos efeitos adversos dos resíduos de pesticidas numa dieta requer uma comparação intra-individual, em situação de exposição a dieta idêntica isenta dos referidos resíduos. A avaliação dos riscos tem que ter em consideração a presença de outros componentes tóxicos naturalmente presentes nos alimentos, bem como a variabilidade metabólica de cada indivíduo (13). A exposição real pode ser maior do que a prevista devido a determinadas preferências alimentares, à variabilidade dos resíduos presentes nos diversos alimentos ingeridos e ao consumo superior à média de um determinado alimento numa só refeição (19).

Atualmente, independentemente das dificuldades em avaliar os riscos da utilização de pesticidas na saúde humana, a autorização para a comercialização de pesticidas na Europa, exige que os potenciais efeitos negativos das substâncias ativas sejam revelados. Essa informação é geralmente obtida a partir de vários testes centrados, por exemplo, no padrão de metabolismo, na toxicidade aguda, sub-crônica ou sub-toxicidade aguda, na toxicidade crônica, carcinogenicidade, genotoxicidade, teratogenicidade, e também ensaios de irritação, usando ratos como mamífero modelo ou, em alguns casos, cães e coelhos. Estes testes incluem experiências como o cálculo da dose letal média (DL_{50}), inalação aguda letal (LC_{50}), efeito adverso não observado (NOAEL), dose diária aceitável (ADI) e dose aguda de referência (ARfD).

As experiências *in vivo* de toxicidade aguda são necessárias para o cálculo da DL_{50} , que se traduz na dose de pesticida necessária para matar metade dos animais testados, após administração por determinada via. Isto é, se a substância é ingerida pelo animal, esta dose corresponde a uma DL_{50} por via oral, enquanto que se for absorvida através da pele, corresponde a uma DL_{50} por via dérmica. Além disso, também pode ser calculada a concentração de LC_{50} , que é a concentração de pesticida necessária para matar metade dos animais expostos por inalação (em 4 horas).

Estes testes são utilizados para classificação das substâncias ativas por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) (20), através do seu perigo inerente demonstrado nos testes de toxicidade aguda (Tabela 3):

Tabela 3: Classificação dos produtos fitofarmacêuticos, por parte da OMS, de acordo com a sua toxicidade aguda (adaptado de (20)).

Classe	Classificação	LD_{50} para rato (mg/kg de massa corporal)			
		Oral		Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente perigoso	<5	<20	<10	<40
Ib	Altamente perigoso	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Moderadamente perigoso	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Pouco perigoso	>501	>2001	>1001	>4001
U	Diferente de apresentar perigo agudo	>2000	>3000	-	-

A LD₅₀ oral é normalmente inferior à LD₅₀ dérmica, uma vez que uma percentagem considerável das substâncias ativas atinge a corrente sanguínea muito mais rapidamente através da absorção ao longo do tubo digestivo do que através da pele.

A validação do uso de um determinado produto fitofarmacêutico requer igualmente um estudo de exposição a longo termo, *in vivo*, numa gama de concentrações abrangente. Estes estudos permitem definir o ponto de referência, ou dose de exposição, abaixo do qual não se verifica a ocorrência de efeitos adversos. Esta dose (ponto de referência), conhecida como nível de efeito adverso não observado (NOAEL) ou ausência de efeito observável (NOEL), é usada para cálculo da dose diária aceitável (ADI) para o Homem. A ADI é um valor numérico, sendo expressa em mg/kg de massa corporal, e determina a quantidade de substância que pode ser consumida diariamente, com segurança, por toda a vida. Este valor de ADI é obtido pela divisão do NOAEL por um fator de segurança ou incerteza, que tradicionalmente é 100. Este fator destina-se a prevenir possíveis diferenças na sensibilidade das espécies, nomeadamente dos animais de ensaio em relação aos seres humanos, bem como as diferenças inter-individuais dentro da população humana (19).

A dose aguda de referência (ARfD) também tem de ser calculada, pois por vezes pode verificar-se um consumo de certos géneros alimentares muito superior ao estimado para um só dia. O valor de ARfD é baseado no NOEL e também ajustado por um fator de segurança ou incerteza, tendo em conta grupos sensíveis da população (por exemplo, crianças). O ARfD é apenas definido para as substâncias ativas que têm um potencial de toxicidade aguda (21, 22).

No que respeita aos limites máximos de resíduos (LMR) nas diferentes culturas, estes são os limites legais estabelecidos para compostos específicos em géneros agrícolas específicos. Os LMR são calculados a partir dos valores da ADI, tendo em conta a quantidade de cada alimento que é suscetível de ser consumida (21).

As decisões sobre os LMR podem ser obtidas não só através dos dados toxicológicos, mas também após condução de exercícios de boas práticas agrícolas nas culturas desejadas. Estas decisões são válidas apenas se o valor de resíduos de pesticidas obtido no primeiro caso for muito inferior ao segundo. Em termos práticos são estabelecidos intervalos de segurança para cada produto fitofarmacêutico, numa determinada cultura, que devem ser respeitados e que dizem respeito ao tempo que medeia entre a aplicação do produto e a colheita. Este período deve estar de acordo com as boas práticas agrícolas e ao mesmo tempo garantir que os limites não são excedidos.

O registo de produtos fitofarmacêuticos é um processo moroso que envolve componentes científicas, legais e administrativas, em que se avaliam os efeitos associados à sua

utilização sobre a saúde humana e sobre o ambiente, de acordo com normas estabelecidas. No caso de Portugal são normas da União Europeia (UE), nomeadamente o Regulamento (UE) nº 544/2011 (23).

O registo é um passo determinante no controlo do uso de produtos fitofarmacêuticos, permitindo às autoridades saber quais os produtos cuja utilização é permitida e para que fins, bem como controlar a qualidade dos produtos fitofarmacêuticos, as taxas de uso, as reclamações, a embalagem, a rotulagem e a publicidade dos pesticidas, garantindo os interesses dos utilizadores finais, bem como a proteção do ambiente. O processo de registo restringe-se à hipótese dos pesticidas serem utilizados apenas para a função pretendida (19). Trata-se de um processo complexo que demora um período de tempo considerável, exige recursos e perícia por parte da autoridade de registo, da indústria de produtos fitofarmacêuticos, e vários grupos de interesse público.

Hoje em dia, os produtos para alimentação humana e animal circulam livremente no mercado interno da UE. Deste modo, é indispensável garantir que todos os consumidores estão igualmente protegidos relativamente à exposição a níveis inaceitáveis de pesticidas presentes nos alimentos que consomem (24). No entanto, convém realçar que a segurança dos consumidores de um país não significa, necessariamente, que todos os consumidores da UE estejam protegidos, pois os padrões de consumo alimentar diferem de um Estado-Membro para outro.

De forma a minimizar as disparidades existentes, a partir de 01 de setembro de 2008, o Regulamento (UE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos LMR de pesticidas nos produtos de origem vegetal e animal passou a definir um novo, e totalmente harmonizado conjunto de regras para resíduos de pesticidas. Este Regulamento simplifica a legislação existente e harmoniza os LMR de pesticidas de forma a serem aplicados em todos os países da UE. Os diferentes anexos do Regulamento (CE) nº 396/2005 especificam os limites máximos de resíduos e os produtos a que se aplicam.

Os resultados da monitorização de resíduos de pesticidas em diferentes matrizes fornecem dados que podem ser usados para conhecer melhor os riscos associados à utilização de produtos fitofarmacêuticos. (13).

No estado atual do uso de fitofármacos, a análise do custo/benefício mostra que o uso adequado de produtos fitofarmacêuticos é compensatório, caso contrário o pesticida não estaria no mercado. No entanto, a longo prazo esta relação custo/benefício só pode ser avaliada após os fitofármacos terem sido utilizados durante um certo período de tempo.

Considerando os efeitos adversos relacionados com a utilização dos produtos fitofarmacêuticos na agricultura, a sua seleção criteriosa em termos de eficácia, custo e segurança para o operador e para o ambiente aparece como sendo uma necessidade imperiosa.

1.3.2. Riscos ambientais. Contaminação das águas

Os produtos fitofarmacêuticos, além dos potenciais efeitos negativos na saúde, apresentam também efeitos adversos sobre o meio ambiente, nomeadamente contaminação do solo, da água e do ar, assim como efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo. Especificando, o uso inadequado de produtos fitofarmacêuticos tem sido associado a: (i) efeitos adversos sobre organismos não-alvo (por exemplo, a redução de populações de espécies benéficas; (ii) contaminação da água a partir de resíduos de pesticidas ou devido à dispersão dos mesmos; (iii) poluição do ar através de pesticidas voláteis; (iv) danos em plantas não-alvo por ação de herbicidas; (v) danos em culturas de rotação por parte de resíduos de herbicidas que permaneceram nos campos; (vi) danos em culturas durante e após aplicação de produtos fitofarmacêuticos devido à utilização de elevadas quantidades, bem como aplicações fora de época ou condições ambientais desfavoráveis (14, 19).

Muitos dos efeitos adversos dos produtos fitofarmacêuticos no ambiente dependem das interações entre as propriedades físico-químicas das substâncias ativas utilizadas, nomeadamente, a pressão de vapor, a estabilidade, a solubilidade e o pKa, assim como, a adsorção e a persistência no solo, os fatores relacionados com o solo (pH, presença de componentes orgânicos, superfícies inorgânicas, a humidade, a microflora, e a fauna), as espécies de plantas e a variação climática. Além disso, a toxicidade, a dosagem aplicada, as condições climáticas predominantes após a aplicação do fitofármaco, e o período de tempo que persiste no meio ambiente, podem explicar os seus efeitos adversos (25).

Os fatores do solo e as condições climáticas têm sido reconhecidos como os mais importantes relativamente ao destino dos pesticidas no ambiente e, consequentemente, à atividade, seletividade e efeitos adversos (14). Infelizmente, uma vez que estes fatores variam de local para local e de ano para ano, os resultados de qualquer estudo de campo sobre o destino e comportamento dos pesticidas são específicos no tempo e no espaço.

A avaliação dos riscos ambientais, assim como o comportamento e o destino de um pesticida são estimados pelo cálculo da concentração previsível no ambiente (PEC), que tem em consideração a distribuição do pesticida em solo, água, sedimentos e ar. A

validação é feita com os dados obtidos em três níveis de testes (necessários para a aprovação do registo) com o intuito de avaliar a toxicidade dos pesticidas sobre os principais organismos não-alvo, Tabela 4 (19). Além disso, também deverá ser calculada a taxa de exposição à toxicidade (TER) para determinar se o risco para um determinado organismo é aceitável ou não. Neste sentido, as taxas de exposição à toxicidade resultantes são comparadas aos correspondentes níveis de teste. Uma taxa de exposição à toxicidade maior que o nível de teste é considerada risco negligenciável para os organismos não-alvo.

Em geral, apenas é necessária uma avaliação detalhada do nível 1 de risco quando o TER é inferior a 100 (Tabela 4). Por sua vez é necessária uma avaliação do risco crónico no caso de o TER ser menor que 10. Se o TER for inferior a 5, o anexo VI da Diretiva da UE 91/414 CEE exige que nenhuma autorização seja concedida a menos que seja claramente estabelecida através de uma avaliação adequada e que em condições de campo nenhum impacto inaceitável ocorra após o uso do produto sob as condições de utilização propostas.

Tabela 4: Os três níveis de teste para avaliar a toxicidade de pesticidas em organismos não-alvo.

Espécies	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	Toxicidade Aguda	Testes de reprodução	Testes de campo
Aves (codornizes ou pato-real)	LD ₅₀ (8-14 dias)		Estudo do ciclo de vida dos peixes
Peixes de água doce (truta arco-íris ou peixinhos)	LC ₅₀ (96 h)	Efeitos sobre a desova	
Invertebrados aquáticos (Dáfnia, camarão)	LC ₅₀ (48 h)	Ciclo de vida completo	
Invertebrados não-alvo (abelha do mel)	LD ₅₀ (48 h)	Efeitos de resíduos na folhagem	Teste de campo para polinização
Invertebrados não-alvo (minhocas)	LC ₅₀ (14 dias)	Efeitos de resíduos na folhagem	
Plantas aquáticas (algas)	LC ₅₀ (96 h)	Vigor da planta	
Outras espécies benéficas	LD ₅₀ (48 h)		

O solo agrícola é normalmente o destinatário primário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados, no entanto, os cursos de água e lençóis freáticos que estão adjacentes a áreas agrícolas são, na grande maioria dos casos, os destinatários finais dos resíduos de pesticidas (25). Por esta razão quando são abordados os potenciais efeitos adversos dos fitofármacos sobre o meio ambiente, as autoridades europeias exigem dados (antes da comercialização de produtos fitofarmacêuticos na Europa) relacionados com os riscos associados à exposição de organismos não-alvo terrestres e aquáticos a resíduos de pesticidas.

1.4. Métodos de análise de resíduos de pesticidas

Os produtos fitofarmacêuticos têm ajudado as populações a cultivar alimentos em abundância e a eliminar inúmeras pragas. Mas infelizmente, tal como referido anteriormente, estes produtos podem também ter diversos efeitos negativos, quer sobre o meio ambiente quer sobre os seres humanos. Assim a utilização de produtos fitofarmacêuticos deve ser cuidadosamente monitorizada e controlada de forma a maximizar os benefícios e minimizar os efeitos prejudiciais. Para monitorizar o uso adequado de produtos fitofarmacêuticos, diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos de forma a detetar e quantificar níveis específicos de resíduos de pesticidas quer nos alimentos quer no meio ambiente (26).

O número de resíduos de pesticidas a monitorizar de forma a garantir a proteção dos consumidores pode ser substancial, mesmo considerando apenas um produto agrícola específico. Isto deve-se ao facto dos agricultores escolherem diferentes produtos fitofarmacêuticos para controlar a enorme variedade de insetos, fungos ou ervas que atacam as suas culturas. Recomenda-se igualmente a rotação de princípio ativo como forma de reduzir a possibilidade de serem criadas resistências entre as pragas, aumentando assim o número de resíduos possivelmente encontrados.

O registo dos produtos fitofarmacêuticos, tanto nos Estados Unidos da América como na UE (Regulamento (UE) nº 544/2011), implica a submissão de um método analítico validado para determinação da substância ativa (e os seus metabolitos farmacologicamente significativos) como ferramenta para a deteção e quantificação dos LMR em alimentos e rações. Estes métodos destinam-se a realizar a análise individual de um resíduo específico (ou de um grupo de compostos relacionados derivados deste) numa determinada cultura, uma vez que no momento do registo tem de ser atribuída uma aplicação particular consoante o género agrícola. Para a confirmação de resultados positivos, estes métodos tornam-se uteis como métodos de referência, por serem destinados a uma combinação específica pesticida/matriz e validados independentemente.

Por estas razões os diferentes laboratórios frequentemente adotam um método multirresíduo, isto é, uma metodologia que pode ser utilizada na análise de uma ampla gama de resíduos de pesticidas. A análise multirresíduo em alimentos é um grande desafio devido ao elevado número e diversidade de resíduos, assim como, ao tipo de amostras.

As propriedades físico-químicas das espécies a analisar condicionam as abordagens para o sucesso da extração, do processo de limpeza e da deteção. Um aspeto importante a ter em consideração, é a polaridade dos resíduos, que pode ser estimada através da

sua solubilidade em água ou do seu coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}). Quando os pesticidas em análise têm propriedades de ácidos fracos ou bases fracas, parâmetros como pH e força iônica são aspectos críticos na abordagem da análise. Outros fatores que devem ser tidos em consideração são a volatilidade e a estabilidade, que indicam quais as precauções a ter para evitar perdas ou degradação das espécies a analisar.

Tal como se verifica em outras análises químicas a nível vestigial, a análise de resíduos de pesticidas tem alguns passos fundamentais que estão esquematizados na Figura 4.

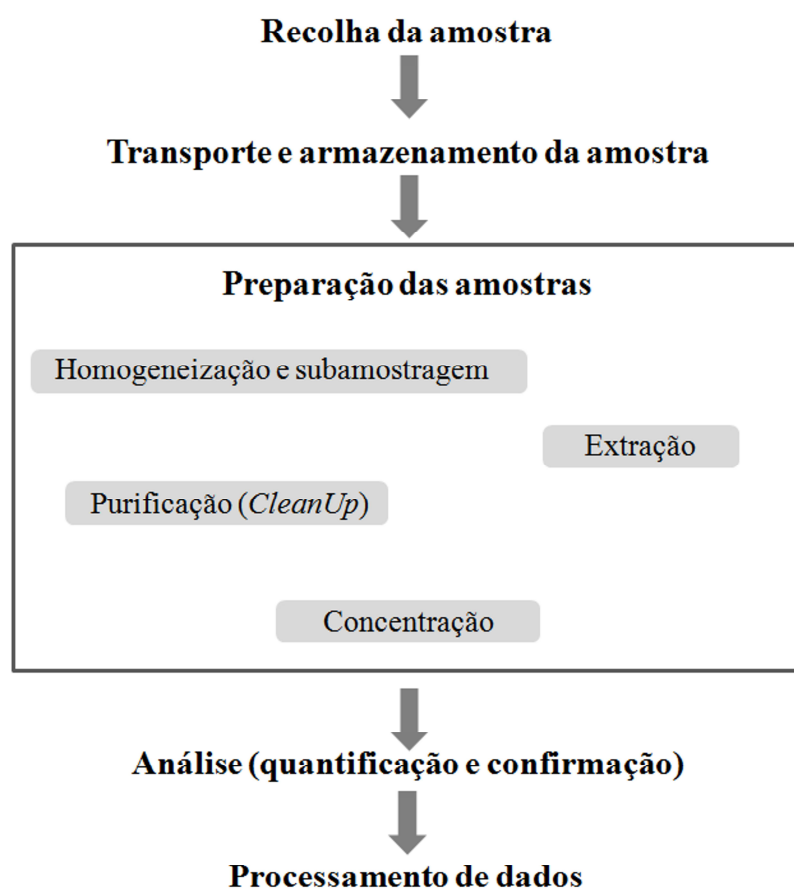


Figura 4: Esquema geral dos procedimentos necessários para a análise de resíduos de pesticidas em diferentes amostras.

1.4.1. Amostragem

Geralmente, na elaboração de um método analítico, a amostragem por vezes é negligenciada, por se considerar que esta não faz parte do processo laboratorial de análise, embora seja um fator importante que influencia grandemente os resultados finais (27).

As amostras enviadas para os laboratórios podem consistir em amostras individuais de diferentes origens, sem qualquer informação sobre as suas condições. Os números exatos e tamanhos das amostras variam de acordo com regulamentos de cada entidade reguladora. Na UE a Diretiva 2002/63/CE (28) estabelece métodos de amostragem para o controlo oficial de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de produtos de origem vegetal ou animal, em que são definidos procedimentos de forma a possibilitar a obtenção de uma amostra representativa de um lote, de acordo com o género alimentar, tendo em atenção a sua forma e tamanho.

As amostras sólidas podem exigir preparação para posterior armazenamento e análise, tais como, cortar e triturar. A maioria dos laboratórios corta e homogeneiza a amostra total, a menos que a regulamentação aplicável exija a preservação de uma porção inalterada da amostra apresentada. As amostras são homogeneizadas usando os processadores de alimentos comerciais comuns (o tamanho do processador pode variar dependendo do tipo de amostra), promovendo simultaneamente a maceração e a mistura da amostra (26).

No que diz respeito à subamostragem, a forma mais simples para melhorar a eficiência de um método analítico é a redução do tamanho da amostra a uma quantidade mínima, que forneça resultados fiáveis. Ao minimizar o tamanho da amostra reduz-se a utilização de solventes orgânicos e, consequentemente, os resíduos da sua utilização. Reduz-se também o esforço e o custo da análise. É de realçar que uma fragmentação e subamostragem cuidadosa poderão conduzir também a uma economia de tempo na análise (13).

A subamostra deve ter o menor tamanho possível que satisfaça os requisitos de homogeneidade da amostra e, no entanto, ser suficientemente grande para se alcançarem os limites de deteção (LD) desejados no extrato final (assumindo que a matriz não é a interferência limitante). Quando os procedimentos de análise apropriados são seguidos e um bom equipamento é usado, uma amostra de 10 g é frequentemente aceitável para análise de pesticidas em frutas e legumes.

1.4.2. Preparação das amostras

Este processo tem como objetivo a obtenção de um extrato suficientemente puro e com teores dos compostos a analisar que possam ser detetados e quantificados, partindo de uma subamostra representativa da amostra inicial.

A extração dos pesticidas da matriz é um aspeto crucial no processo analítico. No entanto, esta poderá ser influenciada por diferentes parâmetros, nomeadamente: a composição da matriz, a sua fragmentação, o pH, os solventes usados na extração, o teor de água, a temperatura, a razão solvente:amostra, o método de extração e o tempo de extração (29). Outros parâmetros, como o tipo e quantidade de sal adicionado e a pressão também influenciam o processo de extração.

Cada um dos parâmetros que influencia a extração pode afetar as recuperações, estabilidade e seletividade dos resíduos de pesticidas, deste modo, é importante conhecer a influência de cada parâmetro, de forma a evitar possíveis contrariedades no método analítico.

1.4.2.1. Extração

A extração é o procedimento através do qual as espécies a analisar presentes numa amostra são dissolvidas e transferidas para um solvente, ou uma mistura de solventes, adequada para o processo de análise. Significa o isolamento dos compostos em estudo removendo as substâncias interferentes, e geralmente envolve um enriquecimento da concentração das espécies a analisar para um nível que permita a sua determinação analítica.

Convencionalmente, a extração dos resíduos de pesticidas das amostras começa com um passo de homogeneização, seguido por uma extração com um ou mais passos de purificação, para remover os compostos indesejáveis que foram extraídos em conjunto com os analitos. Os procedimentos geralmente utilizados na extração de resíduos de pesticidas incluem a extração líquido-líquido (LLE) com solventes, extração em fase sólida (SPE), extração por fluidos supercríticos (SFE), extração líquida pressurizada (PLE), extração assistida por micro-ondas (MAE), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), extração por QuEChERS ("*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*"), e técnicas de microextração líquido-líquido.

Extração líquido-líquido (LLE)

A extração através de solventes é provavelmente a técnica mais utilizada e pode ser efetuada em vários dispositivos (3). Inicialmente eram utilizados solventes orgânicos muito poluentes para efetuar as extrações, mas com o avançar dos tempos e também devido ao aumento das preocupações ambientais, foi diminuída a toxicidade dos solventes, efetuando uma partição mais eficiente dos compostos da matriz para o solvente de extração, e obtendo extratos suficientemente purificados e concentrados para a análise em cromatografia (30).

Os solventes miscíveis com a água, tais como o metanol, o acetonitrilo e a acetona são os solventes de extração mais comuns, juntamente com o acetato de etilo, embora este seja apenas parcialmente solúvel em água. A quantidade de água presente nos frutos e vegetais varia entre os 80-90%. Assim, a utilização dos solventes descritos anteriormente juntamente com a amostra, formam uma solução com a água intrínseca do produto alimentar, transformando-se num meio de extração eficiente para os resíduos de pesticidas. Isto é, forma-se uma solução orgânica de percentagem variável, de acordo com as propriedades verificadas para a melhor extração dos resíduos de pesticidas. Quando necessário, pode ser adicionada água de forma a compensar o baixo conteúdo de água em algumas amostras. Por exemplo, frequentemente, são adicionados 10-20 ml de água a amostras com baixa humidade (ex., trigo, arroz, soja) para aumentar a proporção aquosa no solvente extrator (31). Em termos práticos, cada solvente tem vantagens e desvantagens.

O acetonitrilo pode apresentar vantagens sobre os outros solventes, porque não extrai juntamente com os resíduos de pesticidas, componentes das matrizes alimentares, tais como, lípidos, proteínas, açúcares, e sais minerais (32). O acetato de etilo também é um solvente de extração muito seletivo em alimentos com baixo teor de gordura, mas a sua eficiência é maior em combinação com um agente de secagem (por exemplo, Na_2SO_4). A grande desvantagem do acetato de etilo é que este também extrai as gorduras presentes na matriz alimentar. O acetonitrilo é mais seletivo, no caso de géneros alimentares como o abacate, ovos, leite, mariscos e carnes, que possuem conteúdo lipídico moderado. No entanto, em alimentos com elevado teor de gordura, como a banha, é necessário um solvente apolar (como o acetato de etilo) que se dissolva e penetre na gordura. Só assim é possível extrair os pesticidas altamente lipofílicos que por vezes se encontram nessas matrizes (13, 33).

A acetona é o solvente menos seletivo dos referidos anteriormente. No entanto, é utilizada comumente como solvente de extração devido à sua extensa utilização em

métodos de análise de resíduos de pesticidas validados por entidades reguladoras dos Estados Unidos da América (30).

A simples agitação da amostra com o solvente deve ser a primeira escolha no procedimento de extração. Usualmente proporciona resultados aceitáveis de extração dos resíduos de pesticidas em amostras (32), sendo aceitável para a extração em muitos produtos hortícolas e vegetais. No entanto, têm de ser tomadas precauções no que respeita à extração de pesticidas sistêmicos em alimentos pastosos ou com elevado teor de gordura, em que a agitação não permite uma fácil penetração do solvente na matriz. E, por isso, fundamental maior fragmentação das amostras, o que pode conduzir a degradação de alguns resíduos de pesticidas. Deste modo, a simples agitação com um solvente orgânico é uma abordagem razoável para a extração da maioria dos resíduos de pesticidas de frutas e legumes (13). A LLE também pode ser auxiliada por ultrassons ou refluxo, de forma a facilitar a penetração do solvente na matriz alimentar, e assim melhorar a extração dos resíduos.

O Aparelho de Soxhlet é um dos dispositivos que pode ser utilizado para a extração dos resíduos de pesticidas (34), baseando-se o processo também na extração com solventes. Este dispositivo consiste num reservatório de vidro que se situa entre uma parte inferior que recolhe o extrato, normalmente um balão, e um condensador na parte superior. O Soxhlet permite extrair os compostos de interesse a partir de uma amostra sólida, utilizando um solvente orgânico adequado, e deixando para trás as impurezas insolúveis no mesmo. A grande desvantagem deste aparelho é a elevada quantidade de solvente necessária, bem como o elevado tempo requerido (35).

A LLE também poderá ser incrementada através da utilização de um sistema de ultrassons. A seletividade para a extração é devida ao solvente de extração utilizado, porém o sistema de ultrassons permite uma melhor penetração deste na matriz e, consequentemente, a um aumento da extração dos analitos (35).

Extração em fase sólida (SPE)

Atendendo a preocupações ambientais decorrentes da utilização de grandes volumes de solventes orgânicos, na década de 90 verificou-se o aumento da procura de alternativas aos procedimentos baseados na extração por solventes para a análise de resíduos de pesticidas.

A extração em fase sólida (SPE) tornou-se a abordagem mais comum de purificação na análise de resíduos de pesticidas (36, 37). Convencionalmente, a SPE utiliza cartuchos de plástico contendo um material de extração em fase sólida, entre 100 e 1000 miligramas. Uma panóplia de outros dispositivos e procedimentos são necessários para a realização deste método (37), tais como: dispositivos de vácuo, pré-condicionamento das colunas, recolha de frações com resíduos de solventes e de interferentes, recolha das frações contendo os compostos de interesse, as etapas de evaporação do solvente, etc. Outros sistemas de SPE utilizam as fases sólidas contidas em discos, pontas de pipeta, ou placas de 96 poços.(13).

A SPE é uma das técnicas mais comumente utilizadas para purificação e limpeza de extratos em análises de resíduos de pesticidas (34), o que se justifica porque os cartuchos de SPE e os discos são compactos, descartáveis, de fácil utilização, relativamente seletivos, amplamente aplicáveis, e versáteis. Permitem também, concentrar os compostos a analisar e o consumo de solventes é baixo comparativamente aos métodos tradicionais, podendo ser utilizados em paralelo para aumentar o rendimento de extração da amostra, e ser automatizados (37).

Existe atualmente uma grande variedade de fases sólidas comercialmente disponíveis para serem usadas em SPE. As mais comuns para análise de resíduos de pesticidas são as de sílica, C₁₈, Florisil, Alumina, carvão ativado (GCB), aminopropil (-NH₂), amina primária e secundária (PSA), e divinilbenzeno/poliestireno (36).

Extração por fluidos supercríticos (SFE)

Outra técnica é a extração por fluidos supercríticos (SFE), que é uma alternativa à clássica LLE. Para tal são utilizados fluídos supercríticos na extração. Estes são produzidos pelo aquecimento de um fluido (normalmente um gás, como por exemplo o dióxido de carbono (CO₂)), acima da sua temperatura e pressão críticas, usados para extrair os compostos desejados das matrizes sólidas (30). O fluido supercrítico é facilmente removido após a extração, diminuindo a temperatura ou a pressão, de modo a que este se converta novamente em gás e as espécies extraídas condensem e formem um líquido ou um sólido. Obtendo assim uma redução na utilização de solventes

orgânicos, em que o CO₂ utilizado é relativamente pouco dispendioso, não inflamável e ambientalmente seguro (35).

No entanto, embora a técnica de SFE seja muito seletiva para extrair, uma vez que extrai simultaneamente os pesticidas polares e não polares, é um processo mais moroso do que os métodos de extração com solvente, podendo ser muito afetada pelos efeitos de matriz e requerendo instrumentos dispendiosos (34).

Extração líquida pressurizada (PLE)

Outra das técnicas que aumenta a velocidade do processo de extração é a técnica de extração líquida pressurizada (PLE), em que são utilizados solventes orgânicos comuns, mas a pressões e temperaturas elevadas, uma vez que o solvente de extração tem de ser mantido na fase líquida (38). Esta técnica tem uma versão patenteada que dá pelo nome de *Accelerated Solvent Extraction* (ASE), trata-se de um sistema totalmente automatizado, que requer menores quantidades de solventes que as técnicas tradicionais, reduzindo o tempo de extração. Assim, um procedimento de extração que poderia levar várias horas num dispositivo de Soxhlet, pode ser realizado em alguns minutos e com uma amostra muito mais pequena (34).

Após a sua introdução em 1995 teve uma rápida aceitação, tendo como maiores vantagens: o seu processo relativamente simples, rápido, eficiente e ambientalmente mais sustentável. Por outro lado, as condições de operação podem levar a uma menor seletividade, sendo necessário um processo de purificação posterior (38).

Extração assistida por micro-ondas (MAE)

Na extração assistida por micro-ondas (MAE) as amostras são extraídas com solventes orgânicos comuns e irradiadas com micro-ondas, aquecendo o solvente e a amostra, mas sem permitir a entrada em ebulição. A irradiação pode ser repetida várias vezes, de forma a obter um máximo de extração para os analitos (34). Assim, este método aumenta a taxa de transferência de massa dos compostos a analisar, da matriz da amostra, para o solvente de extração (36).

No entanto, pode ocorrer redução da seletividade bem como a degradação de compostos termolábeis. Outras desvantagens residem no facto de apenas ser possível utilizar um recipiente de extração para cada amostra e é uma técnica de difícil automatização (35).

Dispersão de matriz em fase sólida (MSPD)

Atualmente, as tendências apontam no sentido da utilização de quantidades cada vez menores de amostra, do aumento da seletividade e especificidade da extração, através de uma metodologia mais amigável ao ambiente, isto é, em que se verifique um menor desperdício e a utilização de uma menor quantidade de solventes orgânicos. Outro parâmetro a ter em consideração é a possibilidade de automatização dos novos métodos de forma a reduzir a operação manual. Neste contexto, diferentes técnicas de microextração têm vindo a ser desenvolvidas, utilizando quantidades mínimas de solventes e menos etapas na preparação das amostras (13).

A dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é outra técnica de extração alternativa que poderá ser aplicada para a extração de resíduos de pesticidas. Uma pequena quantidade de amostra é incorporada num composto sorvente (geralmente inerte como o C_{18}), e a purificação é efetuada ao mesmo tempo que a extração (39). Mas cada vez mais os materiais de suporte utilizados na MSPD são semelhantes aos utilizados na SPE. Assim, tem de se encontrar um bom compromisso entre os tamanhos de partícula e a necessidade de uma grande área de superfície para a dispersão da amostra, de forma a melhorar o contacto com o solvente, reduzindo os custos do suporte sólido e restrições de fluxo, ou mesmo entupimentos da coluna, quando utilizados tamanhos de partículas menores (38).

Esta técnica tem algumas vantagens de conveniência sobre a abordagem convencional de extração da amostra, pois a conjugação dos passos de extração e purificação reduz o tempo de análise (40). Por outro lado, a quantidade muito pequena de amostra utilizada (0,1-2 g) embora vantajosa pode transformar-se num problema, pois é difícil obter uma amostra suficientemente representativa e homogênea de forma a auferir resultados consistentes.

Microextração em fase sólida (SPME)

Outro tipo de técnica de extração dos resíduos de pesticidas é a utilização de dispositivos de extração através da sorção dos compostos da amostra, sendo as formas comercialmente disponíveis para este tipo de extração a microextração em fase sólida (SPME) e extração sortiva em barra de agitação (SBSE). Numa outra variante destas técnicas, o revestimento está contido num tubo, semelhante a um pequeno pedaço de uma coluna capilar de cromatografia gasosa (35). Todas estas técnicas derivam da mesma abordagem, em que um material, tal como o polidimetilsiloxano (PDMS) entre outros, é revestido sobre uma fibra ou barra magnética, de forma a extrair os compostos

de interesse a partir de uma solução aquosa ou amostra gasosa (36, 41, 42). O tipo e a quantidade de resíduos de pesticidas que são extraídos para o revestimento dependem do coeficiente de partição (K_{ow}) do resíduo de pesticida, do volume do revestimento, do volume da amostra, do tempo, da temperatura, dos efeitos da matriz, do pH, da força iônica, da composição do solvente adicionado na extração, assim como, de fatores mecânicos. Quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior será a quantidade de analito extraída (41, 43, 44).

Esta técnica eliminou limitações e obstáculos encontrados nas técnicas convencionais, tais como a não utilização de solventes orgânicos, associada a grande purificação do extrato obtido e a simplicidade de manipulação. Assim, as vantagens gerais da técnica de SPME são (i) utilização de um dispositivo compacto; (ii) capacidade de análise de multirresíduos; (iii) operação simples; (iv) possibilidade de tempos de análise curtos; (v) extração seletiva bem como purificação simultânea com o processo de extração (vi) método robusto de injeção em cromatografia gasosa (isto é, os contaminantes não contactam com o *liner*, nem entram na coluna); (vii) possibilidade de automatização; (viii) análise quantitativa; (ix) baixos limites de detecção para alguns compostos, (x) eliminação de solventes orgânicos; (xi) baixo custo global por análise e (xii) utilização de uma pequena quantidade de amostra.

As aplicações mais apropriadas da técnica de SPME relacionam-se com a análise qualitativa dos componentes voláteis de amostras gasosas. Por outro lado no caso da SBSE esta revela-se mais apropriada na análise de resíduos de pesticidas em amostras líquidas, principalmente água. Usualmente, as versões comerciais de SPME disponíveis são utilizadas com um amostrador automático e a injeção no cromatógrafo gasoso é realizada imediatamente após a extração. Ocorre uma extração seletiva dos compostos em associação com um processo de purificação, sendo apenas necessário selecionar os materiais que constituem a fase sólida. Um número reduzido de materiais de revestimento estão disponíveis no mercado e os dispositivos de SPME e SBSE não são suficientemente baratos para a sua eliminação após uma única utilização. Assim, as análises terão de ser efetuadas sequencialmente, isto é, uma nova análise só poderá ser efetuada após limpeza dos dispositivos e nova extração, sendo o ritmo de amostragem limitado pelos tempos de equilíbrio e análise. A sensibilidade de análise pode ser muito elevada (isto é, são alcançados limites de detecção muito baixos para pesticidas relativamente não polares que apresentem bom coeficiente de partição para a fase de revestimento), porém muitas vezes traduz-se no aumento dos tempos de equilíbrio, em que as análises podem durar horas para atingir esses limites (13).

Idealmente a extração dos resíduos de pesticidas deveria ser completa, instantânea e seletiva. A dificuldade reside no facto de os compostos apresentarem diferentes coeficientes de partição entre a matriz da amostra e a fase de revestimento da fibra. Os componentes da matriz usualmente afetam esta interação no processo de equilíbrio e condicionam os resultados. Também, o meio líquido em que é possível efetuar esta extração não pode conter uma elevada percentagem de solvente orgânico, uma vez que os compostos de interesse não serão adsorvidos pela fibra devido ao seu coeficiente de partição. Diferentes parâmetros têm de ser tomados em consideração como temperatura, fase aquosa e orgânica, volumes, tempo, e tratamentos da amostra (como por exemplo adição de cloreto de sódio) que podem aumentar a recuperação e o processo de equilíbrio.

Extração por QuEChERS

Ainda dentro das técnicas de extração, a constante busca e necessidade de uma forma simples e rápida de um método multirresíduo eficaz, capaz de fornecer alta qualidade aos resultados analíticos, levou a que Anastassiades *et al.* (32) desenvolve-se um novo método de tratamento e extração da amostra. O acrónimo QuEChERS refere-se a "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe", é uma técnica de preparação da amostra que implica extração por solvente como o acetonitrilo, ou outros solventes orgânicos, seguida de uma partição com sulfato de magnésio ou em combinação com outros sais, geralmente NaCl. Após esta extração inicial segue-se um passo de limpeza usando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), isto é, são adicionadas pequenas quantidades de diferentes fases sólidas ao extrato. O sorvente mais utilizado no d-SPE é a amina primária e secundária (PSA), enquanto outros, tais como C₁₈, OASIS HLB, carvão ativado ou Florisil também podem ser usados. Após o processo de limpeza, o extrato é centrifugado e o sobrenadante pode ser diretamente analisado ou, se for necessário, pode ser concentrado (32). Esta técnica tem atraído a atenção de laboratórios de pesticidas em todo o mundo, sendo neste momento a metodologia de extração mais regularmente empregue na análise multirresíduo de pesticidas em frutas e vegetais (45).

Ao método original a partir da publicação de 2003 (32), foram efetuadas ligeiras modificações, normalmente de acordo com as preferências pessoais de cada analista ou na tentativa de favorecer a extração de um certo tipo de resíduos em relação a outros, isto é, o método pode ser modificado dependendo do tipo de amostra e dos analitos alvo. Quando foram conduzidas diferentes experiências de validação para centenas de

pesticidas em diferentes géneros alimentares, foi descoberto que havia cerca de 10 pesticidas que mostraram dependência do pH nas recuperações, consoante a matriz em uso (46). O tamponamento a pH=5 foi o melhor compromisso para alcançar recuperações aceitáveis para estes pesticidas dependentes do pH (33, 47).

A adição de C₁₈ juntamente com a PSA, no passo d-SPE ajuda a melhorar a limpeza de algumas amostras, em especial aquelas que contêm lípidos, tais como o azeite, embora a congelação também precipite componentes da matriz que possuem solubilidade limitada em extratos QuEChERS. O C₁₈ na d-SPE é mais rápida e mais fácil. A redução da quantidade de carotenoides e clorofila extraída juntamente nos extratos também pode ser minimizada através da adição de uma pequena quantidade de carvão ativado (GCB), mas neste caso poderá ocorrer uma redução na recuperação de alguns pesticidas com estrutura planar (46).

Atualmente existem três métodos de QuEChERS muito populares, sendo o primeiro e designado de original, o método do QuEChERS apresentado em 2003 (32). Depois existem duas tentativas de normalização de método de QuEChERS, através do Oficial Method AOAC 2007.01 (47), e o método CEN Standard Method EN 15662. Depois destas três versões existem dezenas de diferentes modificações, pois o método é extremamente flexível e robusto no sentido em que com pequenas modificações continuam a obter-se elevadas recuperações, para centenas de resíduos pesticidas numa grande variedade de produtos alimentares (46).

A grande desvantagem deste método reside nos fatores de enriquecimento que são baixos, e a menos que sejam utilizados detetores cromatográficos sensíveis, é necessário realizar um passo de concentração da amostra.

Técnicas de microextração líquido-líquido

Retomando a LLE, tem-se tentado atualmente efetuar diversos melhoramentos de forma a contornar algumas das desvantagens descritas anteriormente. A miniaturização deste tipo de técnica levou a uma redução drástica do volume da fase extratora. Baseadas nestas premissas três novas técnicas foram criadas, isto é, a microextração em gota suspensa ("*Single drop microextraction*" - SDME), microextração em fase líquida com fibra oca ("*Hollow fiber liquid-phase microextraction*" – HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), podendo estas técnicas de microextração ser nomeadas de forma muito diferente (48).

A SDME é uma técnica de preparação de amostra simples, de baixo custo, rápida e virtualmente livre de solventes, baseada na grande redução da razão solvente de

extração/volume de amostra. Não é uma técnica de extração exaustiva, isto é, apenas uma pequena quantidade dos analitos são extraídos ou pré-concentrados para a análise. Consiste numa técnica de pré-concentração baseada na utilização de uma pequena gota de solvente orgânico, normalmente suportada numa seringa, não solúvel com a água, que é exposta à solução da amostra. Esta exposição tem três formas distintas de acontecer: uma quando é diretamente imersa na solução; outra quando esta gota é apenas colocada no espaço acima da solução sem contacto com a mesma (chamado “headspace”) de forma a extrair compostos voláteis ou semi-voláteis; e quando é utilizado um outro solvente menos denso que a água e a gota é apenas imersa nesse solvente de forma a realizar a extração (49).

A principal desvantagem da SDME é a instabilidade da gota em situações de elevada agitação ou temperatura, especialmente quando as amostras apresentam muitos compostos interferentes sólidos, e por outro lado, não podem ser utilizados solventes com solubilidade relativamente alta em água e com baixo ponto de ebulição, devido à sua elevada taxa de dissolução ou evaporação (48).

No caso da HF-LPME é utilizado um modo de amostragem em duas fases, em que uma fibra oca hidrofóbica é utilizada para proteger e expor um certo volume de solvente de extração à amostra. O processo de extração ocorre nos poros da fibra oca, onde o solvente foi imobilizado (50).

A fibra oca, normalmente, é formada de polipropileno e suportada por uma seringa. O solvente de extração deve ter uma polaridade semelhante ao da fibra oca para ser facilmente imobilizado dentro dos poros. Em geral, a eficiência de extração obtida com HF-LPME é maior do que com SDME, uma vez que as fibras ocas hidrofóbicas permitem o uso de uma velocidade de agitação maior, a fim de acelerar a cinética de extração. Além disso, a área de contacto entre a amostra aquosa e a fase de extração é maior do que no caso de SDME, favorecendo a taxa de transferência de massa. A utilização da fibra oca fornece proteção à fase extrativa e, portanto, a análise das amostras sujas, é viável. Além disso, o reduzido tamanho de poro permite a microfiltração da amostra, produzindo assim extratos muito limpos (49).

No caso do DLLME é baseado na formação de suspensão nublada formada quando uma mistura apropriada de um solvente de extração e um solvente de dispersão são rapidamente injetados numa solução aquosa (51).

Esta técnica simples e rápida foi introduzida por Rezaee *et. al* (52) e é baseada num solvente de extração apropriado, isto é, uma pequena quantidade de um solvente orgânico com alta densidade, tal como o tetracloreto de carbono, o clorofórmio, o dissulfureto de carbono, o nitrobenzeno, o bromobenzeno, o clorobenzeno, ou o 1,2-

diclorobenzeno, e um solvente dispersante com miscibilidade elevada, tanto em fase de extração quanto na fase aquosa, tal como o metanol, o etanol, o acetonitrilo ou a acetona. Quando a mistura entre a fase de extração e o dispersor é rapidamente injetada na amostra com uma elevada turbulência, este regime turbulento dá origem à formação de pequenas gotículas, que são dispersas em toda a amostra aquosa. Após a formação da solução turva, a área de superfície entre o solvente de extração e a amostra aquosa é muito grande, de modo que o estado de equilíbrio é conseguido de forma rápida e, por conseguinte, o tempo de extração é muito curto. Na verdade, esta é a principal vantagem do DLLME. Depois de centrifugar a solução turva, a fase sedimentada na parte inferior de um tubo cónico é recuperada e utilizada na deteção analítica mais apropriada. Em DLLME, ao contrário do SDME, a seringa não é utilizada como suporte de gota durante o processo de extração, mas é utilizada na recolha e injeção do extrato, evitando assim problemas, tais como o deslocamento da gota (51).

No entanto, esta técnica é limitada a um pequeno número de solventes de extração, que podem extrair eficientemente os analitos de interesse uma vez que têm de ser asseguradas as seguintes condições: ter uma maior densidade do que a água, a formação de uma solução turva e estável, e ser facilmente removido do fundo do frasco cónico após centrifugação. Poucos solventes conseguem atender a estas condições. Além disso, esta técnica de microextração é difícil de automatizar e a sua aplicabilidade a amostras alimentares é limitada (48).

As gotículas emulsionadas têm uma grande área interfacial com a amostra. A dispersão líquido-líquido desempenha um papel essencial em processos de separação e sistemas de reação. Isto porque a grande área interfacial devido à dispersão facilita a transferência de massa e velocidade de reação (51).

Normalmente nas técnicas miniaturizadas da extração com solvente são utilizados solventes orgânicos, mas nos anos mais recentes começaram também a aplicar-se diferentes líquidos iónicos, de forma a reduzir ainda mais os solventes orgânicos clássicos (49).

1.4.2.2. *Purificação (CleanUp) e concentração da amostra*

A maioria dos extratos brutos iniciais das amostras exigem purificação antes da análise, com o objetivo de reduzir os compostos interferentes da matriz e enriquecer a concentração dos resíduos de pesticidas no extrato obtido. Este é constituído por uma mistura complexa do solvente orgânico, água, nutrientes (tais como, lípidos, açúcares, aminoácidos e proteínas), e metabolitos secundários (ácidos orgânicos, alcalóides, terpenóides, etc.) em concentrações elevadas comparativamente às quantidades muito pequenas dos resíduos de pesticidas. Isolar e detetar resíduos de pesticidas quando estes se encontram na presença de níveis elevados de produtos químicos que interferem com a sua deteção é um desafio, pois estes promovem um efeito vulgarmente designado por interferência de matriz.

Idealmente, o método de extração atinge os 100% de recuperação dos resíduos de interesse e não contem quaisquer compostos interferentes da matriz a analisar mas, na prática, esta condição não se verifica na maioria das vezes (13). A robustez do sistema analítico é também fundamental para a análise inequívoca dos diferentes compostos, isto é, a separação cromatográfica dos compostos desejados em relação aos elementos da matriz, leva a uma não interferência direta na sua deteção. Embora seja efetuada esta separação por parte dos sistemas cromatográficos, verifica-se frequentemente que os compostos de matriz causam indiretamente a supressão ou aumento do sinal analítico, ou então levam a uma maior necessidade de manutenção do instrumento.

Em geral os métodos multirresíduo requerem uma ou mais técnicas de purificação. Normalmente, quanto maior for o número de etapas de limpeza incluídas, maiores são as perdas dos compostos a analisar e mais tempo é despendido na realização da análise.

Diferentes abordagens para a limpeza de extrato podem ser utilizadas, nomeadamente processos de separação com base: (i) no tamanho das moléculas (cromatografia de permeação em gel (GPC) ou filtração por membranas), (ii) na volatilidade (destilação), (iii) nas propriedades eletroquímicas (diálise ou troca iónica), (iv) na solubilidade (precipitação) ou (v) na partição líquido-líquido ou sólido-líquido.

A utilização de técnicas de GPC é um procedimento adequado para remoção dos extratos de moléculas grandes, evitando a acumulação de compostos não voláteis nos instrumentos analíticos, melhorando assim a robustez do método (42). No entanto, a GPC é um método demorado, com elevados gastos de solvente e procedimentos relativamente dispendiosos. A extração de amostras com elevado teor de gordura requer frequentemente a GPC para remover lípidos extraídos juntamente com os compostos a analisar. Após a utilização de GPC os extratos precisam de ser concentrados antes de serem injetados no equipamento (muitas vezes através de uma partição líquido-líquido

com um solvente apropriado, como o acetato de etilo) e reconcentrados novamente após a recolha da fração contendo os pesticidas. Esta técnica funciona bem e melhora a robustez da análise, no entanto, quando os compostos interferentes têm um peso molecular semelhante aos compostos a analisar não permite efetuar a sua remoção. Frequentemente realiza-se GPC em combinação com outros procedimentos de limpeza, tais como a partição líquido-líquido ou sólido-líquido (13).

A partição líquido-líquido é comumente utilizada para a purificação de resíduos de pesticidas em alimentos com elevado teor de humidade, quando se utiliza um solvente miscível em água para a extração. Nestes casos, geralmente, a primeira medida tomada é a remoção da maior parte da água presente no extrato, de forma a concentrar os resíduos de pesticidas. Uma grande quantidade de água pode ser removida através da partição entre o solvente orgânico e a adição de diferentes sais à fase aquosa, o que leva a uma melhor separação de fases (26).

A utilização de acetona nos extratos aquosos iniciais, requer a partição com um solvente como o diclorometano, o éter de petróleo, ou acetato de etilo/ciclohexano, esta combinação de solventes resulta numa separação de fases, em que as interferências mais polares ficam na fase aquosa (alguns pesticidas polares também se perdem nesta fase), no entanto, a adição de sais e o controlo do pH do sistema ajuda a promover a partição dos resíduos de pesticidas para a fase orgânica.

No caso da extração com acetonitrilo, a utilização de sal por si só é suficiente para induzir esta separação de fase aquosa e fase orgânica, não sendo necessário a adição de um solvente apolar. No método de QuEChERS, o sulfato de magnésio anidro é considerado um sal com características excelentes para induzir partição líquido-líquido entre o acetonitrilo e a água e permitir elevadas percentagens de recuperações para os pesticidas polares. A sua combinação com cloreto de sódio serve para modificar a partição dos compostos de modo que os açúcares permaneçam na camada aquosa (32). Outra vantagem do acetonitrilo é que este não é miscível com solventes orgânicos de cadeia longa, como os alcanos. Assim, a partição líquido-líquido pode ser realizada com solventes, tais como hexano ou iso-octano para ajudar a remover lípidos que também tenham sido extraídos (neste caso, os pesticidas apolares tenderão também a passar para o solvente apolar).

As técnicas anteriormente referidas são eficazes na remoção de grandes quantidades de água, podendo os vestígios de água remanescentes ser removidos pela adição de sais desidratados higroscópicos (por exemplo, Na_2SO_4 anidro) à fase orgânica do extrato (26). Nos métodos analíticos baseados em SPE é possível remover diferentes constituintes das plantas (tais como lípidos, ceras, pigmentos e alguns metabolitos secundários)

através da passagem do extrato pelo material de enchimento do SPE (34). Dependendo do material utilizado, esta pode ser uma forma eficiente de remover os interferentes altamente apolares. Com uma mistura de solventes adequada são eluídos os resíduos de pesticidas e os interferentes apolares ficam retidos nas colunas. A remoção destes interferentes apolares numa fase inicial de purificação permite uma melhor manipulação da amostra nas fases posteriores. Por exemplo, alguns destes compostos podem precipitar durante a concentração da amostra, afetando a percentagem de recuperação dos resíduos de pesticidas (37, 53).

Como referido anteriormente, os resíduos de pesticidas encontram-se nas amostras geralmente em concentrações muito baixas, verificando-se a necessidade de concentrar os extratos, em 100 ou mais vezes, para uma melhor deteção e quantificação. Várias técnicas de concentração podem ser utilizadas, mas as mais usuais são o recurso a evaporadores rotativos ou evaporação através de uma corrente de gás (normalmente azoto). Os evaporadores rotativos são eficazes na remoção dos diferentes solventes orgânicos, encontrando-se já disponíveis no mercado dispositivos que têm em consideração os pesticidas termolábeis e altamente voláteis. A concentração da amostra através do ligeiro aquecimento do extrato sob uma leve corrente de gás (ar ou azoto) também é uma forma eficiente e de baixo custo para atingir a concentração desejada.

Os métodos de purificação de extratos de amostras alimentares têm então o intuito de reduzir um fenómeno adverso designado efeito de matriz, que é causado pela presença inevitável de componentes da matriz que são extraídos juntamente com os resíduos de pesticidas. Quando a análise dos resíduos é efetuada em cromatografia gasosa (GC), estes efeitos podem ter impacto em todos os passos da análise (injeção, separação e deteção) levando a uma quantificação imprecisa, diminuição da detetabilidade dos resíduos, redução da robustez do método, podendo mesmo levar à obtenção de falsos resultados, quer positivos quer negativos (54, 55).

Os efeitos de matriz ocorrem durante a introdução da amostra no GC, verificando-se uma degradação ou adsorção dos compostos, fenómeno designado por “aumento da resposta cromatográfica por indução da matriz” (ou em inglês “matrix-induced response enhancement”). Quando um extrato é introduzido no sistema cromatográfico, os diferentes componentes da matriz tendem a preencher (ou bloquear) determinados sítios ativos do *liner* de injeção e da coluna, reduzindo assim as perdas de analitos suscetíveis a ligações irreversíveis de adsorção ou degradação. Este fenómeno resulta numa maior transferência destes compostos para a coluna de GC e, conseqüentemente, os seus sinais analíticos sofrem um incremento em comparação com a injeção de soluções orgânicas puras dos mesmos compostos. Se as soluções padrão dos resíduos de

pesticidas são preparadas apenas com solventes orgânicos e utilizadas na construção das curvas de calibração, então a concentração das espécies a analisar nas matrizes alimentares estará sobrestimada. Diferentes pesticidas podem sofrer este efeito, principalmente os pesticidas termolábeis (56).

Na prática é quase impossível efetuar uma desativação completa dos *liners* e colunas do sistema de GC, bem como efetuar uma purificação completa dos extratos. Foi necessário encontrar técnicas alternativas para superar este problema (54).

Uma das formas de tentar diminuir este efeito reside na utilização de técnicas de injeção alternativas em GC, isto é, que diminuem a degradação térmica dos analitos e o tempo de residência dos mesmos no orifício de injeção. Assim a técnica de temperatura programada de vaporização (PTV) pode conduzir a uma redução significativa do aumento de sinal, mas raramente à sua eliminação total (57). Outra forma é a utilização de substâncias designadas de protetores de analito. Estes compostos que interagem fortemente com os diferentes sítios ativos dos sistemas de GC, não permitindo o acesso dos resíduos a estes locais. Normalmente, são compostos capazes de efetuar pontes de hidrogénio, tais como compostos com múltiplos grupos hidroxilo (um dos exemplos são os derivados dos açúcares) que representam um dos grupos mais efetivos dos protetores de analito. Quando adicionados aos extratos da amostra e aos padrões de calibração preparados apenas em solvente, os protetores de analito podem induzir o mesmo aumento de resposta em ambos os casos, resultando assim numa equalização eficaz do efeito de matriz (56).

Atualmente, o método mais amplamente utilizado para compensar o efeito da matriz é a preparação dos padrões de calibração em matriz, em vez da preparação em solvente. Isto é, os padrões de calibração são adicionados a matrizes livres de resíduos de pesticidas e semelhantes às matrizes das amostras reais, sendo executados os mesmos passos analíticos aplicados às amostras (56).

1.4.3. Quantificação e confirmação de resíduos de pesticidas

A combinação da extração e purificação da amostra é, geralmente, designada de preparação da amostra, e a separação analítica associada à detecção, é denominada procedimento analítico, ou, simplesmente, análise. No caso da análise de substâncias orgânicas, como os resíduos de pesticidas, é quase sempre necessária uma etapa de separação analítica, mesmo que se pretenda apenas detetar um único composto.

Os métodos multirresíduo dependem de técnicas cromatográficas, em que os compostos são separados para determinação da sua identidade com base no tempo de eluição (tempo de retenção), e quantificados a partir da intensidade da resposta fornecida por um detetor específico. As duas técnicas cromatográficas mais comuns nos métodos multirresíduo são a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (26, 58). A seleção da técnica apropriada para o passo final de determinação analítica depende principalmente das propriedades dos compostos a analisar (58).

A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida (LC) têm sido estabelecidas como métodos excepcionais na separação de diferentes compostos químicos, ou misturas complexas dos mesmos. Atualmente, não se encontram melhores alternativas de separação analítica quando acopladas a um sistema de detecção adequado. A eletroforese capilar (CE) mostrou-se promissora para a análise de pesticidas iónicos, mas a melhor robustez e maiores volumes de injeção de amostra em LC conferiram a esta, vantagens superiores relativamente à CE (59).

Geralmente os resíduos de pesticidas são organizados em grupos de acordo com as suas propriedades físico-químicas e é escolhido um sistema específico, isto é GC ou LC (normalmente de fase reversa), de forma a serem eficazmente analisados. Nos métodos multirresíduo, o dispositivo de GC com colunas capilares é sempre que possível preferido, porque apresenta melhores separações analíticas, tem limites de detecção geralmente mais baixos, e possui um maior número de detetores diferentes que lhe podem ser acoplados. Assim, a LC é geralmente reservada para resíduos de pesticidas que apresentam propriedades iónicas ou polares, termicamente lábeis, e menos voláteis (58). Devido ao menor número de pratos teóricos de separação em LC, e ao modo de separação baseado na polaridade dos compostos, os métodos de LC são normalmente concebidos para uma classe individual de pesticidas, enquanto pesticidas com propriedades mais diversificadas podem ser analisados recorrendo a um único método de GC. No entanto, devido aos avanços mais recentes em LC, nomeadamente, a disponibilidade de novos instrumentos de LC/MS-MS, provavelmente, esta tornar-se-á uma das primeiras abordagens para a maioria dos pesticidas, e a GC passará a ser

usada principalmente para os pesticidas termicamente estáveis, não polares, e voláteis (13).

As propriedades físicas e químicas de grande parte dos pesticidas são compatíveis com a análise por GC. Deste modo, o cromatógrafo gasoso tornou-se no instrumento analítico de abordagem inicial na monitorização de resíduos de pesticidas. Pesticidas voláteis e com diferentes pressões de vapor, relativamente estáveis a alta temperatura, solúveis em solventes orgânicos, e que contêm grupos químicos diferentes das interferências de matriz são geralmente analisados por GC (58).

Uma grande variedade de detetores para GC está disponível e têm sido extensamente avaliados em análises cromatográficas. O detetor fotométrico de chama (FPD), o detetor de captura de eletrões (ECD), o detetor de ionização de chama alcalina (NPD), e o detetor de condutividade eletrolítica líquido (ELCD) são relativamente insensíveis às substâncias interferentes e exibem sensibilidade seletiva para muitas das classes de pesticidas (60).

Na análise de pesticidas organoclorados por GC, a deteção é frequentemente realizada usando o detetor de ECD ou o detetor ELCD, que não só detetam os pesticidas organoclorados em níveis razoavelmente baixos, mas também têm o potencial para detetar mais interferências presentes nos extratos. Para a análise de pesticidas organofosforados (pesticidas que contêm enxofre), são normalmente utilizados detetores de chama como o detetor FPD, pois apresentam níveis mais baixos de deteção e maior seletividade (capaz de distinguir fósforo de enxofre na deteção). O detetor de NPD (ou detetor de fósforo e azoto) também pode ser utilizado para a análise de ambos os grupos de pesticidas mas, apesar da sua elevada sensibilidade, é um pouco menos seletivo devido à possível presença de interferências de azoto nas matrizes a analisar (60).

Os métodos multirresíduo podem ser caracterizados com base nos sistemas de deteção utilizados. A dependência de detetores seletivos e específicos reduz o número de falsos resultados positivos. Sem sistemas de deteção seletivos, as respostas de GC seriam difíceis de interpretar. Além da espectrometria de massa (MS), poucos outros detetores de GC podem ser comumente usados na análise de resíduos de pesticidas.

A técnica de GC/MS é uma abordagem indispensável na monitorização dos resíduos de pesticidas por parte dos laboratórios. A deteção por MS é a única técnica adequada, sensível e acessível que é capaz de, simultaneamente, fornecer resultados quantitativos e qualitativos. Os vários instrumentos MS utilizados para análise de pesticidas incluem analisadores do tipo quadrupolo, do tipo *ion trap* ou armadilha de iões, e sistemas de *time of flight* (TOF), e cada tipo possui vantagens e desvantagens.

Também diferentes técnicas de ionização são possíveis em GC/MS para proporcionar maior informação e limites de detecção (LDs) mais baixos. Na análise de multirresíduos por GC/MS, a ionização por impacto eletrónico (EI) é a mais vulgarmente utilizada.

A ionização química (em modo positivo ou negativo) é uma abordagem mais suave de ionização que tende a fornecer LDs menores, dependendo do pesticida. No entanto, não é tão amplamente aplicável em métodos de pesticidas multiclasse e não fornece tanta informação estrutural sobre os compostos a analisar como a EI (13).

Atualmente os limites de detecção em GC/MS, especialmente operando em programas de monitorização de iões selecionados (SIM) e MS-MS, conseguem atingir, em muitos casos, os níveis observados com os detetores seletivos de GC referenciados anteriormente. No entanto, nos casos de detecção em modo SIM e MS-MS é geralmente necessário a compartimentação da corrida em segmentos de tempo, o que pode limitar o número de analitos alvo detetados num segmento, estando normalmente os cromatogramas limitados a um número máximo de cerca de 100 pesticidas.

No início da década de 2000, atendendo à falta de detetores, as técnicas de LC não eram muito utilizadas em análises multirresíduo comparativamente às técnicas de GC, apesar do facto de existirem mais pesticidas adequados para análise por HPLC. Neste tipo de cromatografia, os detetores de absorvância UV-visível, de índice de refração ou o electroquímico, que geralmente não são seletivos nem sensíveis o suficiente para aplicação em análise de resíduos de pesticidas, foram substituídos pelo uso do detetor de díodos (DAD), que melhora a seletividade e tem maior aplicabilidade. Contudo, a abordagem mais comum em métodos de resíduos de pesticidas é a detecção por fluorescência com derivatização pós-coluna (por exemplo, N-metil carbamatos, fenilureas, e o glifosato). Para os compostos naturalmente fluorescentes, a técnica de fluorescência é um método excelente devido ao elevado grau de seletividade, com um baixo LD, e uma boa gama de linearidade (58, 59).

A combinação das técnicas de detecção não destrutivas de DAD e fluorescência num único método aumenta a seletividade e expande a gama de resíduos de pesticidas que podem ser detetados em LC (58, 59). Estes detetores podem também ser usados em série antes da detecção por MS, de forma a proporcionar uma maior informação, embora a técnica de MS seja quantitativa e qualitativa por si só.

A disponibilidade de equipamento comercial com detetores de ionização a pressão atmosférica (API) que, normalmente, incluem a ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI), levou a uma revolução nos métodos de LC. O custo desta cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (e MS-MS) ainda hoje é muito elevado, mas decresce lentamente. Muitos laboratórios

começaram a utilizar este tipo de abordagem em rotina para a análise de resíduos de pesticidas porque permite conjugar seletividade e sensibilidade num âmbito analítico amplo (61). A maioria dos novos pesticidas que estão a ser desenvolvidos por empresas agroquímicas apresenta uma melhor performance de análise quando são utilizadas técnicas de LC/MS que podem proporcionar mais informação estrutural sobre uma molécula do que qualquer outra técnica analítica. Apesar das técnicas de GC/MS (com a disponibilidade de MS/MS) existirem há vários anos, atualmente estão a ser substituídas por técnicas de LC/MS (com a disponibilidade de MS/MS) na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (62).

1.4.4. Resíduos de pesticidas em alimentos de origem vegetal

Se as boas práticas agrícolas referentes à aplicação de produtos fitofarmacêuticos fossem seguidas, os resíduos de pesticidas não seriam encontrados em níveis que violassem a legislação. Em teoria, todos os agricultores deveriam seguir estas regras sendo, neste caso, a análise dos resíduos de pesticidas em produtos agrícolas supérflua. No entanto, as boas práticas agrícolas nem sempre são seguidas e, por isso, ocorrem violações aos valores de limites máximos estabelecidos para os resíduos de pesticidas. A monitorização de rotina é uma ferramenta fundamental para verificar o cumprimento das boas práticas.

Idealmente, qualquer análise de produtos agrícolas deve fornecer informações de valor acrescentado de forma a justificar o seu custo. Se as amostras não contiverem resíduos acima dos limites legais, a análise apenas conduz à perda de unidades, com potenciais atrasos na distribuição e redução do período de validade. O custo destas análises é elevado, resultando num aumento dos preços dos alimentos no consumidor final. Mas, por outro lado, existem provas suficientes de que os produtos fitofarmacêuticos acarretam riscos significativos para a saúde humana e para o ambiente. A incerteza desses riscos conduziu a um conceito conhecido como o “princípio da precaução”. Essencialmente, este princípio segue a máxima de que é melhor prevenir do que remediar, em que podem ocorrer erros pelo lado da precaução, mas não na segurança e saúde das pessoas. Assim, na situação atual, faz todo o sentido a análise de resíduos de pesticidas nos alimentos, uma vez que o consumidor tem perceção de que estes resíduos acarretam risco para a sua saúde, e só assim se sente seguro ao consumir diferentes produtos agrícolas, pois sabe que existe monitorização e legislação que regula os limites máximos de resíduos de pesticidas (13).

Os produtos agrícolas que apresentam maior variedade de resíduos de pesticidas são os frutos e vegetais (26), que se consomem com um baixo grau de processamento.

A complexidade das matrizes alimentares, influencia fortemente a aptidão dos métodos analíticos relativamente à pesquisa de resíduos. Consequentemente, a grande variedade de alimentos limita a praticabilidade da validação de novos métodos analíticos para todas as matrizes alimentares. Por esta razão, as diferentes entidades propuseram que certos géneros alimentícios possam servir como referência para outros tipos de alimentos de natureza semelhante.

A recomendação da SANCO/12495/2011 (63) define que aquando da validação de metodologias analíticas podem ser utilizadas matrizes representativas para cada grupo de géneros agrícolas, de acordo com o anexo 1 da mesma recomendação. Assim temos que, por exemplo, a alface é o elemento representativo do grupo dos vegetais folhosos e

ervas frescas, sendo o tomate um dos elementos representativos dos frutos e hortícolas/cucurbitáceas.

1.4.5. Resíduos de pesticidas em amostras ambientais

O uso de fitofármacos em todo o mundo aumentou nas últimas décadas, coincidindo com as mudanças nas práticas agrícolas e com a produção intensiva. Este uso generalizado, resultou na presença de resíduos de pesticidas em várias matrizes ambientais.

Os programas de monitorização ambiental são essenciais para a elaboração de descrições extensivas das concentrações de resíduos de pesticidas atuais, tendências, emissões e fluxos, de forma a controlar o cumprimento das normas e parâmetros de qualidade. Além disso, a monitorização ambiental fornece uma base viável para a adoção de medidas, estratégias e políticas eficazes com vista à resolução de problemas ambientais à escala local, regional ou global.

A seleção dos pesticidas para monitorização ambiental depende da natureza dos pesticidas e dos objetivos do estudo da monitorização. Estas pesquisas centram-se nos resíduos de pesticidas mais utilizados, quer na área agrícola próxima dos locais estudados quer os resíduos de maior interesse para o país em causa. Esta seleção também tem de ter em conta as diferentes propriedades dos compostos.

O meio ambiente não é um sistema simples e, conseqüentemente, a monitorização de resíduos de pesticidas em qualquer matriz ambiental é sempre desafiadora, pois podem ocorrer em qualquer uma das suas fases (sólida, líquida ou gasosa). As principais matrizes ambientais analisadas para a pesquisa de resíduos pesticidas incluem a água, o solo, os sedimentos, ou o ar. No entanto, cada uma destas matrizes primárias inclui muitos tipos de amostras diferentes.

Os sistemas aquáticos são veículos importantíssimos para a dispersão ambiental destes poluentes e, neste sentido, a sua importância como matriz a monitorizar deverá ser considerada. A contaminação da água aparece geralmente relacionada com risco associado a dois cenários diferentes: no primeiro caso, associado à ingestão de água por parte de seres humanos e animais e, no segundo caso, relacionada com os efeitos ecotoxicológicos quando organismos não-alvo (por exemplo organismos aquáticos e anfíbios) estão expostos a resíduos presentes na água nos seus habitats.

Por todo o mundo foram adotados limites e legislação referente à presença dos pesticidas na água. No caso da UE, a legislação estabelece os valores paramétricos de pesticidas na água de 0,1 µg/L para um único pesticida, e 0,5 µg/L para o somatório de todos os resíduos de pesticidas encontrados, através da Diretiva 98/83/CE e DL 306/2007.

Um método completo para análise de pesticidas na água, como para outras matrizes, inclui sempre a preparação e purificação da amostra e um método de deteção dos analitos. A necessidade de atingir níveis de deteção de resíduos de pesticidas em

quantidades vestigiais, como os referidos anteriormente, significa que uma amostra de água deve ser concentrada, de modo a que o extrato da amostra final possa fornecer a sensibilidade adequada para deteção.

1.5. Referências

1. Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, et al. Global consequences of land use. *Science*. 2005;309(5734):570-4.
2. Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*. 1997;277(5325):504-9. Epub 1997/07/25.
3. Nollet LML, Rathore HS. *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
4. Pimentel D. *Encyclopedia of Pest Management*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002.
5. Frank R, Braun HE, Ishida K, Suda P. Persistent Organic and Inorganic Pesticide-Residues in Orchard Soils and Vineyards of Southern Ontario. *Can J Soil Sci*. 1976;56(4):463-84.
6. Seiber JN, Kleinschmidt LA. Contributions of pesticide residue chemistry to improving food and environmental safety: past and present accomplishments and future challenges. *J Agric Food Chem*. 2011;59(14):7536-43.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. 2002; Disponível em: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf> [Acedido em 2012].
8. Tadeo JL. *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007.
9. Jørgen S. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004.
10. European Crop Protection Association (ECPA). *Annual ECPA crop protection statistical review published online*. 2010; Disponível em: <http://www.ecpa.eu/information-page/industry-statistics-ecpa-total> [Acedido em 2012].
11. US Environmental Protection Agency (EPA). 2006-2007 Pesticide Market Estimates: Sales. 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/sales2007.htm> [Acedido em 2012].
12. Cooper J, Dobson H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot*. 2007;26(9):1337-48.

13. Ötles S. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. Boca Raton. FL: CRC Press; 2012.
14. Arias-Estevez M, Lopez-Periago E, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J, Mejuto JC, Garcia-Rio L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agr Ecosyst Environ*. 2008;123(4):247-60.
15. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trac-Trend Anal Chem*. 2011;30(6):814-26.
16. Joshi SC, Sharma P. Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: a review. *Toxicol Environ Chem*. 2011;93(7):1486-507.
17. Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, et al. Endocrine Disrupters: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(1):144-59.
18. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Env Res Pub He*. 2011;8(6):2265-303.
19. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int J Env Res Pub He*. 2011;8(5):1402-19.
20. Organização Mundial de Saúde (OMS). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides*. 2010; Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_HTM_NTD_WHOPES_2010.7_eng.pdf [Acedido em 2012].
21. Lozowicka B, Jankowska M, Kaczynski P. Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food Control*. 2012;25(2):561-75.
22. European Food Safety Authority (EFSA). *The 2009 European Union Report on Pesticide Residues in Food*. 2011; Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/2430.htm> [Acedido em 2012].
23. Comissão Europeia. Regulamento (UE) nº 544/2011 da Comissão que dá execução ao Regulamento (CE) nº 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos requisitos em matéria de dados aplicáveis às substâncias activas. *Jornal Oficial da União Europeia*. Série L, nº 155, 1-66.
24. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Eurpeu e do Conselho relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para

animais, de origem vegetal ou animal. Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 70, 1-16.

25. Poissant L, Beauvais C, Lafrance P, Deblois C. Pesticides in fluvial wetlands catchments under intensive agricultural activities. *Sci Total Environ*. 2008;404(1):182-95.

26. Wheeler WB. *Pesticides in Agriculture and the Environment*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.

27. Ambrus A. Estimation of sampling uncertainty for determination of pesticide residues in plant commodities. *J Environ Sci Heal B*. 2009;44(7):627-39.

28. Comissão das Comunidades Europeias. Diretiva 2002/63/CE estabelece métodos de amostragem comunitários para o controlo oficial de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de produtos de origem vegetal ou animal, Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 187, 30-43.

29. Ni HG, Zeng H, Zeng EY. Sampling and analytical framework for routine environmental monitoring of organic pollutants. *Trac-Trend Anal Chem*. 2011;30(10):1549-59.

30. Torres CM, Pico Y, Manes J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. 1996;754(1-2):301-31.

31. Mastovska K, Dorweiler KJ, Lehotay SJ, Wegscheid JS, Szpylka KA. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *J Agric Food Chem*. 2010;58(10):5959-72.

32. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* 2003;86(2):412-31.

33. Lehotay SJ, Mastovska K, Yun SJ. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J AOAC Int*. 2005;88(2):630-8.

34. Ahmed FE. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trac-Trend Anal Chem*. 2001;20(11):649-61.

35. Ridgway K, Lalljie SP, Smith RM. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J Chromatogr A*. 2007;1153(1-2):36-53.

36. Smith RM. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A*. 2003;1000(1-2):3-27.
37. Pico Y, Fernandez M, Ruiz MJ, Font G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J Biochem Bioph Meth*. 2007;70(2):117-31.
38. Ramos L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J Chromatogr A*. 2012;1221:84-98.
39. Bogialli S, Di Corcia A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *J Biochem Bioph Meth*. 2007;70(2):163-79.
40. Barker SA. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J Biochem Bioph Meth*. 2007;70(2):151-62.
41. Ouyang G, Pawliszyn J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Anal Chim Acta*. 2008;627(2):184-97.
42. Fidalgo-Used N, Blanco-Gonzalez E, Sanz-Medel A. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Anal Chim Acta*. 2007;590(1):1-16.
43. Ouyang G, Pawliszyn J. SPME in environmental analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386(4):1059-73.
44. Aulakh JS, Malik AK, V K, Schmitt-Kopplin P. A review on solid phase micro extraction-high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit Rev Anal Chem*. 2005;35(1):71-85.
45. Nunez O, Gallart-Ayala H, Martins CP, Lucci P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2012;1228:298-323.
46. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*. 2010;1217(16):2548-60.
47. Lehotay SJ. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J AOAC Int*. 2007;90(2):485-520.
48. Pena-Pereira F, Lavilla I, Bendicho C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochim Acta B*. 2009;64(1):1-15.

49. Asensio-Ramos M, Ravelo-Perez LM, Gonzalez-Curbelo MA, Hernandez-Borges J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. *J Chromatogr A*. 2011;1218(42):7415-37.
50. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trac-Trend Anal Chem*. 2010;29(1):1-14.
51. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J Chromatogr A*. 2010;1217(16):2342-57.
52. Rezaee M, Assadi Y, Hosseinia MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A*. 2006;1116(1-2):1-9.
53. Schenck FJ, Lehotay SJ. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *J Chromatogr A*. 2000;868(1):51-61.
54. Hajslova J, Zrostlikova J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *J Chromatogr A*. 2003;1000(1-2):181-97.
55. Menkissoglu-Spiroudi U, Fotopoulou A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. *Int J Environ an Ch*. 2004;84(1-3):15-27.
56. Poole CF. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):241-50.
57. Zrostikova J, Hajslova J, Godula M, Mastovska K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. *J Chromatogr A*. 2001;937(1-2):73-86.
58. Beyer A, Biziuk M. Methods for Determining Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Food Samples-Problems and Challenges. *Crit Rev Food Sci*. 2008;48(10):888-904.
59. Ravelo-Perez LM, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Sep Sci*. 2006;29(17):2557-77.
60. Torres CM, Pico Y, Manes J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. 1996;754(1-2):301-31.

61. Soler C, Manes J, Pico Y. The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food. *Crit Rev Anal Chem*. 2008;38(2):93-117.
62. Malik AK, Blasco C, Pico Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A*. 2010;1217(25):4018-40.
63. Directorate General for Health & Consumers - European Commission (SANCO). SANCO/12495/2011-Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2011. Disponível em: http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_12495_2011_upload2.pdf [Acedido em 2012].

PARTE II

Capítulo 2

Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes



Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes

C. Mansilha^{a,f,*}, A. Melo^b, H. Rebelo^a, I.M.P.L.V.O. Ferreira^b, O. Pinho^{b,c}, V. Domingues^d, C. Pinho^e, P. Gameiro^e

^a Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal

^b Requite, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

^c Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal

^d Requite, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal

^e Requite, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

^f Requite, Universidade do Porto, Porto 1700, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 6 May 2010

Keywords:

Endocrine disruptors
Pesticides
GC–MS
Water
Weighted linear regression schemes
Validation

ABSTRACT

A multi-residue methodology based on a solid phase extraction followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry was developed for trace analysis of 32 compounds in water matrices, including estrogens and several pesticides from different chemical families, some of them with endocrine disrupting properties. Matrix standard calibration solutions were prepared by adding known amounts of the analytes to a residue-free sample to compensate matrix-induced chromatographic response enhancement observed for certain pesticides. Validation was done mainly according to the International Conference on Harmonisation recommendations, as well as some European and American validation guidelines with specifications for pesticides analysis and/or GC–MS methodology. As the assumption of homoscedasticity was not met for analytical data, weighted least squares linear regression procedure was applied as a simple and effective way to counteract the greater influence of the greater concentrations on the fitted regression line, improving accuracy at the lower end of the calibration curve. The method was considered validated for 31 compounds after consistent evaluation of the key analytical parameters: specificity, linearity, limit of detection and quantification, range, precision, accuracy, extraction efficiency, stability and robustness.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decades, humans have introduced hundreds of new synthetic compounds into the nature, that might alter physiological functions causing health problems [1].

One of the topics in environmental toxicology that has received more attention from the scientific community and regulatory authorities worldwide is the issue of endocrine disruption [2,3] and numerous studies have been carried out concerning the possible harmful consequences of human and wildlife exposure [4].

Endocrine disrupting compounds (EDCs) include a wide variety of pollutants, namely substances of different sources of contamination: domestic (estrogens), industrial (plasticisers and heavy metals) and agricultural (some pesticides) [3,5]. Pesticides, even those which are not EDCs, occupy as well a unique position among the chemicals detected in the environment, since they are deliberately used [6].

Despite several countries have banned, in the last years, many pesticides with a recognized negative impact in human health and/or on ecosystems, in favour of more modern pesticide formulations, some of the old compounds remain the cheapest to produce and, for some purposes, highly effective. So, the dilemma of cost/efficacy vs. ecological impacts remains a contentious global issue. In addition, monitoring data for pesticides are generally poor in much of the world, especially in developing and under-developed countries, and despite their inclusion in the monitoring schedule of most developed nations, the cost of analysis and the necessity to sample at several times of the year (linked to atmo-

* Corresponding author at: National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Rua Alexandre Herculano 321, 4000-055 Porto, Portugal. Tel.: +351 919 024 830; fax: +351 223 401 109.

E-mail address: catarinamansilha@gmail.com (C. Mansilha).

spheric conditions and periods of pesticide use) often preclude advancement of an extensive data set [7].

The aquatic environment is particularly susceptible to pollution [8] not only the surface waters but also groundwater's which contamination might be anticipated when the mitigation capacity of the soil system is exceeded [9,10].

As the detection of EDCs and pesticides in environmental matrices can have serious financial, human health and environmental consequences, numerous official environmental organizations and scientific groups have devoted themselves to the development of appropriate analytical methods for their determination. However, low concentrations in addition to the presence of complex aqueous matrices are two major difficulties associated with the detection and quantification of these environmental compounds. Therefore, sensitive and specific analytical procedures are required, as no detectable values are not evidence that the chemical is not present in concentrations that may be injurious to aquatic life and to human health. It is also generally accepted that a screening procedure must be confirmed by a second method based on a different analytical principle to decrease the probability of false-positive results and to provide additional information and assurance about the identity of the detected compounds.

One of the most critical steps involved in the determination of EDCs and pesticides in water is the pre-treatment of samples, which must include procedures for extraction, isolation and concentration of the analytes. Solid phase extraction (SPE) is a widely used methodology that offers an interesting alternative to liquid–liquid extraction providing a drastic reduction of the amounts of organic solvents. SPE coupled with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is commonly accepted as one of the most powerful techniques for the separation, identification and quantification of EDCs and pesticides, even in the nanogram range [11,12]. However, there are several factors involved in the success of the process and the profusion of methods for the same purpose indicate that optimization of the procedures has not always been performed [13–18].

Unequivocal analytical data require a specific set of validation criteria and method performance verification [19]. The importance of validation, at least of routine analytical methods, has been hardly overestimated. This is especially true in the context of quality management and accreditation, which have become matters of increased importance in analytical chemistry in recent years. Therefore, the present trend towards standardization of practices between countries has been at the genesis of the current need of international acceptance of analytical results and accurate validation of methods, which become increasingly important for ensuring a common level of quality.

The aim of the present work was the validation of a multi-residue method for detection and quantification of 32 compounds, including insecticides, herbicides and fungicides with a wide range of polarities, as well as two estrogens. The compounds were chosen among the list of persistent organic pollutants (POPs) of the Stockholm convention [20], the priority substances of Decision No. 2455/2001/EC [21], the final list of chemicals for tier 1 screening of the Endocrine Disruptor Screening Program of Environmental Protection Agency (EPA) [22], the Community Strategy for Endocrine Disruptors [3] and also according to Portuguese Decreto-Lei 506/99, Decreto-Lei 306/2007 and ERSAR [23] in order to comply with the European and Portuguese legislation on water quality.

The developed analytical method was implemented and validated following mainly the International Conference on Harmonisation (ICH) [24–26].

Official documents, based on ICH decisions [27], of regulatory authorities and major international bodies like the European Union [28,29], the Food and Drug Administration (FDA) [30], the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), formerly NCCLS,

[19,31,32], the EURACHEM group [33,34], the International Union of Pure and Applied Chemistry [35], the International Organization for Standardization (ISO) [36], the National Health Surveillance Agency (ANVISA) [37] and the National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO) [38] served also as guidelines for the validation process. Moreover, several articles and reviews with definitions, procedures, parameters and strategies of validation, some of them applied to chromatographic–tandem mass spectrometry methodologies were also analyzed [39–45].

To ensure the reliability of the analytical method the following parameters were regarded as essential: specificity, linearity, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), range, precision, accuracy, extraction efficiency, stability and robustness of the method.

As part of the assay validation a weighted least squares linear regression model (WLSLR) was used to obtain a calibration scheme as the assumption of homoscedasticity was not met for analytical data [29,30,39,46–48]. WLSLR is an efficient method that provides unbiased estimative for prediction, calibration and optimization when standard deviation of the data random errors are not constant across all levels of the explanatory variables. It works by incorporating extra nonnegative constants, or weights, associated with each data point, into the fitting criterion and the size of the weight indicates the precision of the information contained in the associated observation [49].

Optimization and validation of a multi-residue methodology based on a solid phase extraction followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for trace analysis of 32 compounds in water matrices was performed. Matrix-induced chromatographic response enhancement was avoided using matrix-standard calibration solutions and heteroscedasticity has been overtaken by a weighted least squares linear regression model application.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All analytical standards with purity >98% were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol and ethyl acetate were organic trace analysis grade SupraSolv and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile was ChromaSolv grade from J.T. Baker (Deventer, Holland). Acetic acid (glacial) 100% was from Merck (Darmstadt, Germany).

Ultra-pure water (0.054 $\mu\text{S}/\text{cm}$) was obtained using a Milli-Q system from Millipore (Milford, MA, USA).

2.2. Standard solutions preparation

Individual stock standard solutions of 250 mg/L were prepared in methanol by exact weighing of the high-purity substances and accurate dilution. A mixture was then prepared, also in methanol, containing 1.5 mg/L of each individual compound.

Calibration standard solutions, with concentration levels ranging from 15 to 360 $\mu\text{g}/\text{L}$, were prepared by appropriate dilution of the 1.5 mg/L mixture with methanol in 10 mL volumetric flasks.

Matrix-standard calibration solutions (residue-free matrix spiked with standards) with concentration levels ranging from 15 to 360 $\mu\text{g}/\text{L}$ were prepared by spiking 500 mL of water with different volumes of the 1.5 mg/L mixture just before extraction.

Stock standard solutions were stored in amber glass-stoppered flasks at 4 °C.

2.3. SPE procedure

Solid phase extraction was conducted in a SPE vacuum manifold system from Phenomenex (USA).

Table 1

Optimized GC–MS acquisition method parameters for 32 compounds and atrazine- d_5 . Analytes, retention times (R_t), precursor ions and product ions for qualitative and quantitative analysis.

EDCs/pesticides		CAS	R _t (min)	Precursor ion (m/z)	MRM transitions, m/z	
					Identification	Quantification
1	Thiram	137-26-8	5.968	240	88 > 240; 120	88 > 120
2	EPTC	759-94-4	10.845	189	128 > 189; 160; 86	128 > 189
3	Folpet	133-07-3	12.386	296	76 > 295; 260; 130; 104	76 > 104
4	Phosmet	732-11-6	14.071	317	160 > 133; 104; 93; 77; 76	160 > 76
5	2,4-D	94-75-7	14.360	234	199 > 234; 175	199 > 234
6	Atrazine-desethyl	6190-65-4	14.637	187	172 > 187; 145; 104; 58	172 > 187
7	Terbuthylazine-desethyl	30125-63-4	14.840	201	186 > 145; 104; 68	186 > 145
8	Iprodione	36734-19-7	15.271	330	187 > 219; 124	187 > 124
9	Dimethoate	60-51-5	15.413	229	87 > 229; 125; 93	87 > 125
10	Atrazine-d ₅		15.577	220	205 > 220; 178	220 > 205
11	Atrazine	1912-24-9	15.661	215	200 > 215; 58	200 > 215
12	Cyromazine	66215-27-8	15.744	166	151 > 166; 109; 69; 43	151 > 166
13	Terbuthylazine	5915-41-3	15.945	231	214 > 229; 216; 173	214 > 173
14	Pirimicarb	23103-98-2	16.633	238	166 > 238; 72	166 > 72
15	Alachlor	15972-60-8	17.383	269	45 > 269; 188; 160; 146	45 > 160
16	Metalaxyl	57837-19-1	17.565	279	206 > 279; 249; 160; 45	206 > 160
17	Linuron	330-55-2	18.135	248	61 > 248; 160; 46	61 > 248
18	S-Metolachlor	87392-12-9	18.303	283	162 > 238; 211	162 > 238
19	Aldrin	309-00-2	18.449	362	66 > 263	66 > 263
20	Thiamethoxam	153719-23-4	19.060	291	44 > 247; 212; 182; 132	44 > 212
21	Pendimethalin	40487-42-1	19.131	281	252 > 281; 162; 119; 57	252 > 162
22	Cyprodinil	121552-61-2	19.166	225	224 > 225; 77	224 > 225
23	Tolyfluanid	731-27-1	19.348	347	137 > 346; 238; 181; 92	137 > 238
24	Fludioxonil	131341-86-1	20.466	248	248 > 182; 154; 127	248 > 154
25	Dieldrin	60-57-1	20.774	378	79 > 263	79 > 263
26	Endrin	72-20-8	21.220	378	81 > 345; 263; 67	81 > 67
27	o,p'-DDT	789-02-6	21.580	352	235 > 165	235 > 165
28	Fenhexamid	126833-17-8	22.298	302	97 > 301; 266; 179; 177; 55	97 > 301
29	Acetamiprid	135410-20-7	23.102	222	56 > 221; 166; 152; 126; 67	56 > 152
30	Methoxychlor	72-43-5	23.395	344	227 > 344	227 > 344
31	Estrone	53-16-7	24.728	270	270 > 185; 146	270 > 185
32	Estradiol	50-28-2	24.888	272	272 > 213; 172; 160	272 > 160
33	Azoxystrobin	131860-33-8	30.872	403	344 > 403; 388; 372; 75	344 > 388

Some tests were run in order to optimize several factors affecting the extraction efficiency of the procedure, such as: cartridges, sample volume, flow rate, conditioning and elution solvents and pH adjustment.

SPE optimized conditions were as follows: 500 mL of water samples or matrix-standard calibration solutions was spiked with a methanolic solution of deuterated-atrazin standard at 360 $\mu\text{g/L}$. pH was adjusted at 3 with acetic acid (glacial) and 0.5% of methanol was added for improvement of SPE extraction.

Strata X cartridges (200 mg, 3 mL) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and LiChrolut EN RP-18 SPE cartridges (100 mg/200 mg, 6 mL) from Merck (Darmstadt, Germany) were tested. Extraction with SPE cartridges was then used with the subsequent scheme: (a) conditioning step, by the sequential addition of 7 mL of ethyl acetate, 7 mL of methanol and 7 mL of Milli-Q water at a flow rate of 1 mL/min; (b) loading step, by passing 500 mL of the sample through the cartridge at a flow of 5 mL/min; (c) washing step, by rinsing the cartridge with 5 mL water and dried by vacuum pressure during approximately 60 min; and (d) elution performed with 2 \times 2.5 mL of methanol and 2 \times 2.5 mL acetonitrile, at a flow of 1 mL/min.

After elution, the extracts were evaporated to dryness in a rotative evaporator (Buchi/Brinkman Rotavapor RE-111 & Water Bath B-461) and then re-suspended until a final volume of 500 μL in methanol and directly analyzed by GC/MS.

2.4. GC/MS analysis

Chromatographic analyses were carried out in a Shimadzu GCMS-QP2010 Gas Chromatograph Mass Spectrometer equipped with a fused-silica capillary column coated with 5% diphenyl-

methylsiloxane, VF-5 MS (30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness) from Varian.

High-purity helium (99.9999%) at a constant flow rate of 1.5 mL/min was used as the carrier gas.

For injection an AOC-5000 auto injector was used. Injections (1 μL) were made in the splitless mode with a 1.0 min purge-off time and injector temperature set at 275 $^{\circ}\text{C}$.

Samples were analyzed using the following oven temperature programme: initial temperature 60 $^{\circ}\text{C}$ (held for 2 min), increased by 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 200 $^{\circ}\text{C}$ (held for 1 min), increased again by 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 275 $^{\circ}\text{C}$ and held at this temperature for 10 min.

GC was directly interfaced to a Shimadzu QP 2010 quadrupole mass spectrometer with an interface temperature of 250 $^{\circ}\text{C}$, and ionization by 70 eV electron impact. The transfer line was set at 275 $^{\circ}\text{C}$ and the source at 200 $^{\circ}\text{C}$.

Positive fragment ions (m/z —ions mass/charge ratio) were analyzed over 43–500 m/z mass range in SCAN mode and in selected-ion monitoring (SIM) mode. Selected ions used for quantification are in Table 1.

As it was possible to select more than one ion, the identities of the peaks were confirmed through ratios of their respective abundances.

Comparison with comprehensive mass-spectral libraries (such as NIST, Wiley and special pesticide libraries as PEST and PESTAI) allowed an unequivocal identification of target compounds.

Instrument control and mass spectrometry data were managed by a personal computer running the LabSolutions GCMS software (2.50 SU3 version).

Validation parameters were obtained by introducing the respective formulas on a Microsoft Excel worksheet.

3. Theory

Appropriate application of analytical tools requires that the methods used are fit for their purpose and the instruments are operating correctly [19], so the analytical performance characteristics of the optimized method were studied and validated.

3.1. Matrix effect

From the standpoint of chromatographic methods validation, the requirements set by regulatory agencies are basically the same. However, when mass spectrometry is used as detection system combined with gas chromatography, some considerations must be made related to the matrix effect, since this may cause a withdrawal or increased efficiency of ionization and hence may experience a change in the sensitivity of the method [50]. The FDA [30] recommends that this parameter should be evaluated during methods validation to ensure that precision, selectivity and sensitivity are not affected.

Matrix-induced chromatographic response enhancement is a phenomenon that causes overestimation of the analytes concentration, or excessively high recovery results, that arise from higher detector responses observed when a substance is injected in a matrix-modified standard solution (matrix-standard) compared to an injection in pure solvent or matrix-free standard solution [51].

It is explained that matrix protects the analytes from adsorption or degradation during transfer from the injector to the column and thus a maximized amount of analyte reaches the detector, leading to a greater response. This theory provided reasonable explanation for recoveries considerably exceeding 100%, which were reported in several studies of different splitless inlet systems for some compounds [51–53].

One of the most reliable approaches is the use of matrix-matched calibration standards, i.e., standards with the same matrix composition as the analyzed samples [29,52,54]. Government laboratories in the United States as well as European guidelines have long used matrix-matched calibration standards for residue measurements whenever it is demonstrated that a combination of an analyte and matrix can result in a matrix-induced enhancement [52].

3.2. Specificity and selectivity

Specificity/selectivity can be assessed in several ways. The ICH [26] as well as the European Commission [29] and FDA [30] suggest that a simple way to assess the specificity is to demonstrate the lack of response in a blank matrix. This assessment is based on the thorough examination and comparison of different blank samples in the range of the expected retention times of the interesting chromatographic peaks [26,55,56]. As acceptance criteria the responses of interfering peaks at the retention time of the analytes should be less than 30% of the response of the limit of quantification (LOQ) standard [29].

A second way to assess the specificity/selectivity is the use of detectors such as mass spectrometers, which allow the comparison of mass spectra of chromatographic peaks with referenced standards and are often the most practical and least equivocal approach to confirmation purposes [29,31,57].

3.3. Calibration and linearity

3.3.1. Simple and weighted linear regression models—background

The choice of an appropriate calibration model is necessary for a reliable quantification. To properly define the relationship between concentration and response the ICH guidelines specified a minimum of 5 points for the study of the calibration line [26].

Least squares linear regression is the most commonly adopted model. However, the magnitude of the product-moment correlation coefficient (r), itself, is a poor indicator of linearity [48,58] as a significant proportion of errors at the lower end of the calibration line can coexist with acceptable correlation coefficients, errors which are underestimated in analyzing the dispersion of the regression parameters [59]. Therefore, the calculation of the random errors in the y -direction ($S_{y/x}$) as well as the standard deviations for the slope (S_b) and intercept (S_a) associated with the line is crucial to the study of linearity [48]. S_b and S_a can be used to estimate confidence limits for the slope and intercept, given by: $b \pm t_{(n-2)}S_b$ and $a \pm t_{(n-2)}S_a$, where the t -value is taken at 95% confidence level and $(n-2)$ degrees of freedom.

One of the common assumptions underlying most process modelling methods, including linear and nonlinear least squares regression, is that each data point provides equally precise information about the deterministic part of the total process variation. However, when there are dynamic ranges of concentration, the condition of homoscedasticity cannot possibly be met, i.e., the variance is not equal in all of the points of the calibration line. This assumption can be achieved by applying the F -test [39,48,60,61].

The study of homogeneity of variances makes part of the evaluation of the calibration line and can raise issues of acceptance that generally implies the decrease of the considered concentration range or the weighting of the linear regression [39,48,60].

The weighted linear regression model is now becoming rather more common despite their additional complexity in cases of heteroscedasticity [48] and it is desirable by some authors [39,42,62].

Unlike linear and nonlinear least squares regression, weighted least squares regression is not associated with a particular type of function used to describe the relationship between the process variables. Instead, weighted least squares reflect the behaviour of the random errors in the model. It works by incorporating extra non-negative constants, or weights, associated with each data point, into the fitting criterion. The size of the weight indicates the precision of the information contained in the associated observation [49].

3.3.2. Fundamentals of weighted linear regression

Given the evidence of heteroscedasticity, the linear weighted regression model is the simplest and the most effective way to harmonise the differences of variances of the line points. Taking into account the objective of WLSLR, appropriate weighting factors, w_i , can be calculated from the inverse of the variances (s_i^{-2}) [48]:

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad (1)$$

The conversion of the linear regression equation in their weighted counterpart is carried out using the term w_i in a and b parameters calculation according to the following equations:

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \cdot \bar{X}_w \cdot \bar{Y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \cdot \bar{X}_w^2} \quad (2)$$

$$a_w = \bar{Y}_w - b \cdot \bar{X}_w \quad (3)$$

In equations, \bar{Y}_w and \bar{X}_w represent the coordinates of the weighted centroid, through which the weighted regression line must pass. These coordinates are given as expected by $\bar{X}_w = \sum_i w_i x_i / n$ and $\bar{Y}_w = \sum_i w_i y_i / n$.

The weighted correlation coefficient (r_w) can be calculated by the formula:

$$r_w = \frac{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i x_i y_i - \sum_i w_i x_i \cdot \sum_i w_i y_i}{\sqrt{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i x_i^2 - (\sum_i w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i y_i^2 - (\sum_i w_i y_i)^2}} \quad (4)$$

To calculate the concentration (x -value) corresponding to any instrumental signal of an analyte (y -value) it is still necessary to

calculate the error associated with the concentration estimation. As the slope and intercept have associated errors and the instrumental signal is also subject to random errors that should not be ignored, this determination is complex, and it often uses the following approximate formula for calculation of the overall error:

$$S_{x_{0w}} = \frac{S_{(y/x)w}}{b} \sqrt{\frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 \sum_i (w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)}} \quad (5)$$

$$S_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (6)$$

In this equation, w_0 is a weighting appropriate to the value of y_0 , from which the experimental value of x_0 is calculated through the calibration curve, \hat{y}_0 values are the points on the calculated regression line corresponding to the individual x -values, n is the number of experimental points used to make the calibration curve, $S_{x_{0w}}$ is the estimated standard deviation of x_0 , \bar{x}_w and \bar{y}_w are the mean of x and y values, respectively. The confidence limits can be calculated as $x_0 \pm t_{(n-2)} S_{x_{0w}}$ with $(n - 2)$ degrees of freedom.

The uncertainty for the calibration curve (U) reflects the variability of the method and should be calculated for each of the standards according to the equation:

$$U = S_{x_{0w}}/x_0 \quad (7)$$

The effectiveness of the weighted regression can be assessed by calculating the percentage relative error (%RE), which compares the concentration (C_{exp}) obtained from the weighted and unweighted regression equations with the theoretical or nominal standard concentration (C_{nom}) [39]:

$$\%RE = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100 \quad (8)$$

The %RE sum, defined as the sum of absolute %RE values, is a sensitive indicator of the quality of fit.

The best w_i will be that which gives rise to a narrow horizontal band of randomly distributed %RE around the concentration axis and presents the least sum of the %RE across the whole concentration range [39].

3.4. Limit of detection and limit of quantification

One of the most common definition of limit of detection (LOD) assumed to be the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from the background noise but not necessarily quantified as an exact value [26] and can be calculated based on the calibration curve parameters [26,32,48].

The limit of quantification (LOQ) is defined, in turn, as the lowest amount of an analyte in a sample that can be quantified with acceptable precision and accuracy [26] and can also be calculated based on the calibration curve parameters [26,32,48].

For GC/MS analysis, the concentration measured in the appropriate matrix to which a suitable reference material has been added should be within $\pm 20\%$ of the expected value with a coefficient of variation not exceeding 20%. The imprecision of the analysis should be determined using a minimum of three measurements [31,63].

3.5. Range

The range is normally derived from linearity studies and is established by confirming that the analytical procedure provides an acceptable degree of linearity, accuracy and precision when applied to samples containing amounts of analyte within or at the extremes of the specified range of the analytical procedure [26,31].

3.6. Precision and accuracy

The precision and accuracy are two of the main parameters in methods validation, as they determine their acceptance.

3.6.1. Precision

The precision of a method is usually expressed as relative standard deviation (RSD) or coefficient of variation (CV) of a series of measurements and was considered at two levels: repeatability and intermediate precision [26].

Repeatability or intra-day precision expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. This study should not be confused with the instrumental precision, which is evaluated by a sequence of repeated injections of the same preparation.

Intermediate precision, commonly referred to as inter-day test or inter-assay precision, evaluate the influence of variations within the same laboratory: different days, different analysts, different equipments, etc. [26,31].

The ICH provides a minimum of 9 determinations for assessment of precision (3 concentration levels/3 replicates) [26], as both precision and bias can vary substantially over the calibration range, hence the need of the evaluation of at least three concentration levels (low, medium, high). Washington Conference as well as FDA and ANVISA required precision to be within 15% (RSD) except at the LOQ which can assume a value $\pm 20\%$ [30,37,63]. ICLS [31] and SANCO [29] defined a RSD not greater than 20% for the three levels.

3.6.2. Accuracy

The ICH defines accuracy as the degree of agreement between the value obtained in a test and a reference value accepted as true [26] and according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) and the International Organization for Standardization (ISO) the term accurately reflects the combination of systematic errors (bias) and random errors (precision) [64–67]. However, it must be mentioned that accuracy is often used to describe only the systematic error component, i.e., in the sense of bias [19,68] and it is common to perform the evaluation by addition of known amounts of a reference substance to the matrix in three different levels of concentration.

Statistically it can be evaluated by comparative analysis (t -test) [48,68]. Thus, for each concentration level, the bias can be obtained comparing the observed concentration that represents the average of the results obtained through the regression model equation of the calibration curve, and the theoretical or nominal concentration [43].

Bias is required to be within $\pm 15\%$ of the accepted true value, except at the LOQ where $\pm 20\%$ is accepted [30].

In addition, the accuracy can be further evaluated through recovery experiments and extraction efficiency. However, it is important to recognize that the analytes in the samples, when analyzed by GC–MS, may have different behaviours compared with spectral standards prepared in pure solvents and injected directly, as already mentioned in “Matrix effect” sub-chapter.

This reflects the need to apply the extraction methodology to the preparation of the calibration curve matrix-standards, which is important regarding the interpretation of recovery. As the analytical curve was obtained by fortification of blank samples, the recovery value turns out to reflect the precision of the different levels of concentration.

The FDA [30], ANVISA [37] and INMETRO [38] also suggest the use of recovery experiments as a measure of accuracy (recovery) and recommend, as ICH [26], the recovery calculation at three concentrations, low, medium and high (15, 90 and 360 ppb), three replications each.

The accuracy can be evaluated using a two-sided Student's *t*-test, with a 95% level of confidence and *n* – 1 degrees of freedom, establishing as null hypothesis (H0): $\mu = 100\%$ and as alternative hypothesis (H1): $\mu \neq 100\%$. The experimental *t*-value (t_{exp}) is calculated by the equation [48,69]:

$$t_{exp} = \frac{(\bar{X}_{rec} - \mu)\sqrt{n}}{S_{rec}} \quad (9)$$

where \bar{X}_{rec} is the average recovery of the method, μ is the expected value (100%), *n* the sample size and S_{rec} the standard deviation of recovery for each fortification level. The calculated value of t_{exp} is then compared with the tabulated *t*-value.

In addition, deuterated-atrazine (2-chloro-4-pentadeuteroethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine or atrazine- d_5) was used as a quality control internal standard, so-called procedural or instrument internal standard, for process evaluation through recovery studies, being added in a constant amount to blanks, samples and calibration standards prior to extraction [31,42,70]. Recovery was calculated comparing the chromatographic peak area of blanks with those obtained in the presence of the compound under analysis.

As acceptance criteria set for these tests, the values should be reproducible and preferably with recoveries in the range of 70% and 120% [29,71].

3.7. Stability

The stability of an analyte must be evaluated during the process of their storage to determine whether the samples are properly preserved at the time of analysis [42,63] as there are several factors that can alter the stability, including: temperature, storage time, the concentration of analyte and matrix [29,72].

3.8. Robustness

Robustness is one of the parameters discussed in the recommendations of ICH [26], EU [29], and the CLSI [19,31], and is usually evaluated in the final stage of the method development/validation, in order to investigate the procedures/conditions that require strict control over its application in routine [68]. In the case of gas chromatography, examples of typical variations are: different columns and different extraction materials (different lots and/or suppliers) [26,31].

4. Results and discussion

4.1. GC–MS method optimization

Individual standards were injected in GC/MS in the full-scan mode. Technical parameters as injection conditions, flow and temperature gradients, were optimized for a better resolution of the chromatographic peaks. The analytes were then identified according to the technique described above (Section 2.4) by both their chromatographic characteristics as the retention time and through their specific fragmentation. Characteristic ion transitions and specific intensity ratios of the product ions were compared with library standards included at NIST, Wiley or PEST with an acceptance criterion of a match above a critical factor of 80%. A private library of our standards mass spectra was then created.

Subsequently, programs were developed in the SIM mode, based on the detection of selected ions for each analyte, with a significant increase in sensitivity (100–1000 times higher than that achieved with the full-scan), elimination of interfering compounds signals and lower limits of detection (Table 1). A multi-residue method was

chosen as it allows the qualitative and quantitative monitoring of several analytes simultaneously.

4.2. Solid-phase extraction procedure

SPE procedure was assessed using ultrapure water spiked at 250 ppb with the compounds under study, except atrazine-desethyl, terbuthylazine-desethyl and dieldrin, which were included in the study some time later. The use of ultrapure water for extraction recoveries determination allowed the assessment of results avoiding signal suppression by co-extracted substances, identified as the main cause of ion inhibition [73].

Some tests were run in order to optimize factors that affect the extraction efficiency of the procedure, such as the cartridges (LiChrolut EN/RP-18 and Strata X), the sample volume (500, 1000 and 1500 mL) and flow-rate, the conditioning and elution solvents and pH adjustment of the water samples.

LiChrolut cartridges presented higher performance in the extraction procedure with greater retention capacity (data not shown). According to the results and literature, a volume of 500 mL was considered sufficient to detect compounds in concentrations at the sub-ppb, without inducing any breakthrough [74,75]. Additionally, it was observed that the efficiency of the extraction decreased when the pH increased, so pH was adjusted at 3.5. Ethyl acetate:methanol:water (7 mL:7 mL:7 mL) and methanol:acetonitrile (2.5 mL:2.5 mL) were shown to be satisfactory as conditioning and elution solvents, rather than dichloromethane:acetonitrile:water (7 mL:7 mL:7 mL) and methanol (5 mL), respectively. Methanol proved to be the best solvent for the final re-suspension of the extracts when compared to dichloromethane or a mixture of methanol:dichloromethane (1:1), with better chromatographic signals for almost analytes. The SPE procedure was already described in the Section 2.

4.3. Matrix effect and extraction efficiency

Matrix-induced effects during GC–MS determination, such as signal enhancement or suppression, were evaluated by comparison of the relative detector responses obtained from matrix-standard solutions and direct injection of methanolic solutions. Results showed significant matrix enhancement effects for almost all compounds, with the exception of aldrin (which showed a suppression of the absolute response with 30% recovery) and thiram that has a significantly reduced recovery, requiring the optimization of the procedure.

The results regarding the recovery rates of each compound in matrix-standard solutions, calculated considering the areas obtained by direct injection as 100%, are shown in Fig. 1.

To counterbalance the matrix effects, method validation was performed using standards prepared under the same experimental conditions applied for the samples, i.e., matrix-matched standards [29,51,52].

The use of a pre-treatment step more or less complex also made it essential the use of a quality control internal standard for assessing the effectiveness of the extraction technique and monitoring the recovery during sample analysis and atrazine- d_5 was chosen for that purpose (recovery results are presented in Section 4.4.4).

4.4. Validation of the method analytical parameters

To ensure that the optimized procedure was suitable for the application in routine analysis, the basic analytical performance parameters such as specificity and selectivity, linearity and linear range, limits of detection and quantification, precision, accuracy, trueness (recovery), stability, robustness as well as measurement uncertainties were determined and assessed.

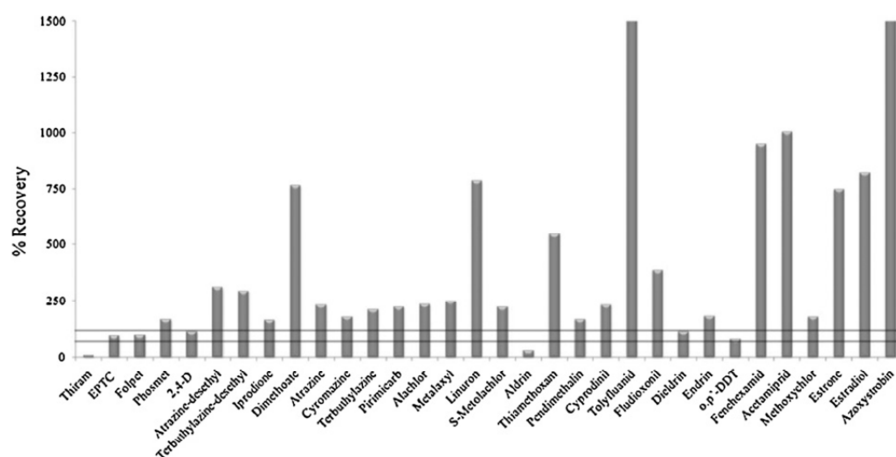


Fig. 1. Matrix-standard solutions recoveries (350 µg/L) calculated considering the areas obtained by direct injection as 100%. The dashed lines represent the range of acceptable recoveries of 70–120%.

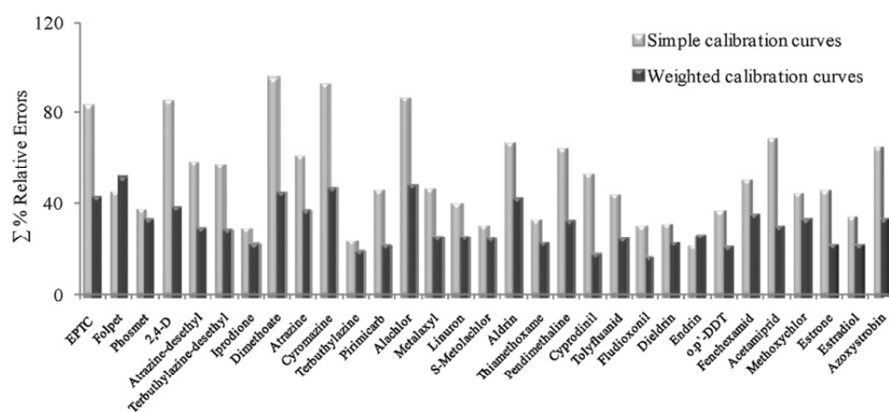


Fig. 2. Sums of relative errors (Σ%RE) for simple and weighted calibration curves.

4.4.1. Specificity and selectivity

For specificity/selectivity, which is essentially a qualitative assessment, analyses of matrix-blank samples (different samples of ultrapure and lab tap water) were performed to tested interferences using the proposed extraction procedure and chromatographic and spectroscopic conditions. The results were compared to those obtained with an aqueous solution of the analytes at concentrations near the limit of quantification. No significant interference has been detected in the retention time of the compounds.

Selectivity was also assessed by the comparison of the analytes mass spectra with spectra from libraries with a similarity $\geq 90\%$ which gave the evidence that the proposed method has a selectivity/specificity in accordance with the standards set forth by the validation authorities.

4.4.2. Calibration curves: linearity and range

Calibration curves have been obtained in SIM mode and, as the assumption of homoscedasticity was not met, linearity was studied using a weighted least squares linear regression model in the concentration range between 15 and 360 µg/L, using six matrix-calibration standards (15, 45, 90, 150, 240 and 360 µg/L each analyte) prepared under the same conditions applicable to the samples and injected in triplicate. Each test was performed in at least three independent experiments. Detection has been performed according to the single molecular ions listed in Table 1.

The weighting factors applied were calculated using Eq. (1), and the sums of relative errors (Σ%RE) were used as quality indica-

tors of adjustment in the assessment of weighted linear regression (Fig. 2).

An example of %RE plots for unweighted (model 1) and weighted (model 2) regressions across the concentration range is shown in Fig. 3.

As it can be seen, the unweighted model overestimates the concentrations in the lower range of the calibration curve, near the limit of quantification. The weighted model presents a best %RE distribution scatter, a lower sum of %RE and, finally, none of the studied compounds showed relative errors greater than the acceptable limits of 15% and 20% for the different calibration line standards and the first pattern, respectively. Similar results were obtained by Almeida et al. [39].

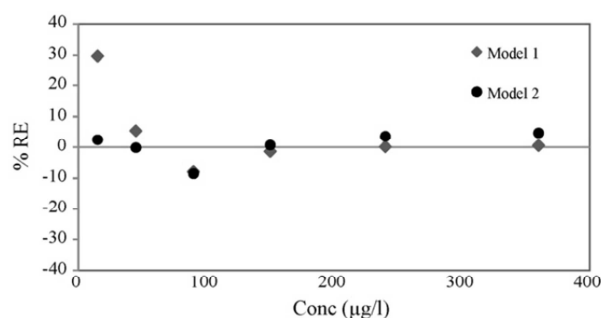


Fig. 3. Percentage of relative errors (%RE) vs. concentration obtained for model 1 ($w_i = 0$) and model 2 ($w_i = s_i^{-2} / \sum s_i^{-2} / n$) for estrone.

Calibration graphs showed linearity for the concentration range of all target compounds. Regression parameters obtained after application of the weighting factors were calculated as described in Section 3.4 and are presented in Table 2. Calibration in the SIM mode was therefore performed using external standardization.

Good linear responses were achieved for each compound, presenting excellent correlation coefficients, equal to or higher than 0.995 for all compounds except for folpet, still above 0.99.

The percentages of $S_{(b)w}/b$ satisfy the validation condition of the calibration curves, with values less than 5% [48].

Good sensitivity (LOD), ranging from 1.60 to 28.80 ng/L, was found for the 31 compounds, under the optimized experimental conditions. Method limits of quantification (LOQ) were also in the ng/L range with values below 0.05 µg/L for 77.4% of the compounds and, in all cases, below the limit imposed by legislation (0.1 µg/L) [76].

The uncertainties associated with calibration curves (U) were calculated for the calibration standards and was noted, as expected, a marked decrease with the increasing of standards concentration, as can be seen for five randomly selected compounds (Fig. 4).

The uncertainties calculated for the first (maximum uncertainty—% U_{15ppb}) and final calibration standard (minimum uncertainty—% U_{360ppb}) is shown in Table 2.

The results suggest the great influence of the concentration and the nature of the compounds, which must be taken into account during the validation of the multi-residue method.

4.4.3. Precision and accuracy

Precision and accuracy were determined by analysis of matrix-calibration standards according to the ICH and FDA recommendations. For repeatability there were performed 9 determinations in the same day (3 concentrations/3 replicates each). For intermediate precision there were performed 3 SPE-GC/MS inde-

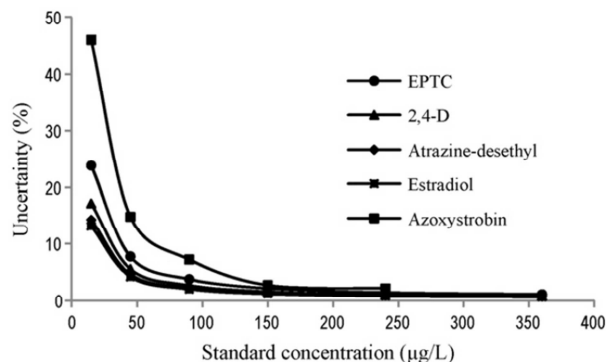


Fig. 4. Examples of the variation of global uncertainty with the calibration standard concentration.

pendent analysis and 9 determinations, corresponding to the three levels of concentration, 1 determination per day in 3 days, were carried out. The results are shown in Table 3.

In order to evaluate the instrumental precision, $n = 5$ replicates of a standard mixture at 240 µg/L level of each pesticide were analyzed under optimum experimental conditions.

Regarding precision, the averages of the coefficients of variation were 11.47% for the inter-day assays and 6.93% for the intra-day tests. Fenhexamid was the only compound that presented values for the inter-day precision on the concentration of 15 and 360 ppb above 20% and 15%, respectively.

Concerning accuracy, bias values varied between –16.68% and 13.64% for the inter-day test and –15.91% and 17.76% for the intra-day test. All the compounds showed values within the proposed acceptance criteria, with the exception of linuron, fenhexamid and acetamiprid, with some unfavourable results only in intra-

Table 2
Method validation data. Calibration parameters and related uncertainties.

EDCs/pesticides	$b_w \pm t_{(n-2)} \cdot S_{(b)w}$ (95%)	$a_w \pm t_{(n-2)} \cdot S_{(a)w}$ (95%)	$S_{(y/x)w}$	$S_{(b)w}/b_w\%$	r_w	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	% U_{15ppb}	% U_{360ppb}
EPTC	143.57 ± 4.16	–781.11 ± 796.79	437.09	1.04	0.9965	9.10	30.40	23.87	1.13
Folpet	73.77 ± 5.03	1502.26 ± 999.45	460.83	2.14	0.9938	18.70	62.50	50.06	2.36
Phosmet	215.61 ± 10.88	257.38 ± 2161.83	996.80	1.59	0.9963	13.90	46.20	36.91	1.72
2,4-D	11.38 ± 0.24	–16.41 ± 45.19	24.79	0.75	0.9960	6.50	21.80	17.16	0.82
Atrazine-desethyl	155.17 ± 2.69	–884.61 ± 516.10	283.12	0.63	0.9987	5.50	18.20	14.28	0.67
Terbuthylazine-desethyl	204.23 ± 3.68	–336.09 ± 705.44	386.98	0.65	0.9995	5.70	18.90	14.81	0.69
Iprodione	40.11 ± 0.87	449.60 ± 173.41	79.96	0.68	0.9994	6.00	19.90	15.78	0.73
Dimethoate	154.23 ± 1.27	–1113.67 ± 242.28	132.91	0.30	0.9992	2.60	8.60	6.70	0.31
Atrazine	161.08 ± 3.09	–602.15 ± 592.67	325.12	0.69	0.9960	6.10	20.20	15.88	0.75
Cyromazine	22.80 ± 2.08	–210.07 ± 413.60	218.60	3.29	0.9966	28.80	95.90	76.87	3.79
Terbuthylazine	207.47 ± 1.05	–245.39 ± 200.61	110.05	0.18	0.9999	1.60	5.30	4.15	0.19
Pirimicarb	640.96 ± 11.40	–779.31 ± 2265.43	1044.56	0.56	0.9984	4.90	16.30	12.95	0.61
Alachlor	189.68 ± 2.02	1276.34 ± 387.33	212.48	0.38	0.9977	3.40	11.20	8.87	0.43
Metaxyl	142.94 ± 9.19	–539.94 ± 1827.37	842.58	2.02	0.9968	17.70	58.90	46.92	2.22
Linuron	184.07 ± 3.19	–125.53 ± 611.02	335.19	0.62	0.9983	5.50	18.20	14.34	0.67
S-Metolachlor	178.01 ± 2.60	–834.52 ± 497.18	272.74	0.53	0.9984	4.60	15.30	12.00	0.56
Aldrin	19.91 ± 1.15	–114.13 ± 219.90	120.63	2.08	0.9988	18.20	60.60	47.60	2.28
Thiamethoxam	96.61 ± 1.97	–159.94 ± 391.89	180.69	0.64	0.9977	5.60	18.70	14.84	0.68
Pendimethalin	34.06 ± 1.01	236.39 ± 193.19	105.98	1.07	0.9982	9.30	31.10	24.40	1.15
Cyprodinil	886.28 ± 12.07	–2042.23 ± 2398.71	1106.02	0.43	0.9988	3.70	12.50	9.92	0.47
Tolyfluand	110.48 ± 4.06	924.17 ± 806.44	371.84	1.15	0.9976	10.10	33.70	26.76	1.25
Fludioxonil	310.56 ± 4.90	–747.35 ± 974.07	449.13	0.50	0.9994	4.30	14.50	11.48	0.53
Dieldrin	133.93 ± 1.81	490.24 ± 345.93	189.77	0.49	0.9997	4.30	14.20	11.12	0.51
Endrin	23.66 ± 1.27	782.46 ± 242.52	133.04	1.93	0.9995	16.90	56.30	44.08	2.02
o,p'-DDT	64.67 ± 0.98	–135.30 ± 188.40	103.35	0.55	0.9997	4.80	16.00	12.51	0.58
Fenhexamid	30.22 ± 1.42	74.06 ± 282.55	130.28	1.48	0.9953	12.90	43.10	34.45	1.62
Acetamiprid	53.47 ± 3.13	–357.54 ± 621.68	286.65	1.84	0.9976	16.10	53.60	51.06	2.40
Methoxychlor	153.73 ± 4.71	216.13 ± 901.08	494.30	1.10	0.9980	9.60	32.20	25.16	1.15
Estrone	90.79 ± 1.88	–542.32 ± 359.99	197.48	0.75	0.9982	6.50	21.80	17.10	0.80
Estradiol	76.11 ± 1.21	–553.75 ± 230.97	126.70	0.57	0.9988	5.00	16.60	13.09	0.61
Azoxystrobin	56.07 ± 3.54	–370.69 ± 704.02	324.62	1.99	0.9972	17.40	57.90	45.96	2.17

b_w —weighted slope, a_w —weighted intercept, r_w —weighted correlation coefficient; $S_{(b)w}$ and $S_{(a)w}$ —standard deviations of the weighted slope and weighted intercept, $S_{(y/x)w}$ —standard deviation of y-residuals of weighted regression line, LOD—limit of detection; LOQ—limit of quantification; U—uncertainties associated with calibration curves.

Table 3
Intra-day, inter-day and instrumental precision (% CV) and accuracy (% Bias).

EDCs/pesticides	Inter-day						Intra-day						Instrumental precision %CV
	Precision (%CV)			Accuracy (%Bias)			Precision (%CV)			Accuracy (%Bias)			
	15	90	360	15	90	360	15	90	360	15	90	360	
Nominal conc. (µg/L)	15	90	360	15	90	360	15	90	360	15	90	360	240
EPTC	6.30	8.04	15.05	−8.80	5.90	−6.66	12.32	8.04	10.00	14.38	−13.78	−11.21	8.00
Folpet	5.92	11.11	9.74	2.52	6.32	−9.95	4.29	5.70	5.06	5.20	7.58	1.85	8.38
Phosmet	17.51	7.57	3.48	9.37	10.80	3.50	9.06	4.46	3.13	−15.91	10.55	7.19	3.86
2,4-D	13.06	11.76	12.89	−5.76	11.84	−13.60	12.60	4.19	8.14	4.47	6.06	−10.76	14.08
Atrazine-desethyl	16.81	10.82	13.19	−2.39	9.29	−10.13	14.64	4.70	6.05	3.42	−12.98	−11.65	14.36
Terbutylazine-desethyl	12.99	4.75	14.20	−0.72	13.64	−13.37	10.27	4.75	5.65	6.56	5.19	−1.06	8.68
Iprodione	12.69	6.44	6.69	6.45	−0.21	−1.82	8.09	2.68	7.36	−12.58	−6.83	2.33	2.94
Dimethoate	14.74	13.17	9.46	−0.33	13.37	−0.81	3.49	2.64	2.23	−0.05	2.61	5.22	1.33
Atrazine	15.73	6.78	11.05	−2.01	6.14	−11.95	8.63	3.26	5.49	−4.86	−2.64	−14.37	5.70
Cyromazine	1.87	4.05	13.73	6.86	0.91	−10.00	0.58	10.09	2.11	2.75	10.09	−9.91	14.95
Terbutylazine	7.52	1.70	14.23	0.03	4.04	−12.49	8.02	1.70	5.96	−3.13	−4.05	−0.33	3.67
Pirimicarb	12.78	11.08	9.89	−15.82	3.05	−5.74	13.79	7.07	8.22	−10.49	−8.74	5.71	5.88
Alachlor	5.46	6.22	5.73	−0.39	10.58	−12.75	5.46	6.43	5.71	−0.39	−9.08	15.53	3.60
Metalaxyl	16.38	8.14	13.16	−6.90	5.71	−14.50	3.13	6.06	8.12	−13.22	11.05	−4.66	3.66
Linuron	17.75	10.08	12.41	−6.25	10.25	−7.44	13.92	10.08	2.35	54.57	34.42	15.59	6.92
S-Metolachlor	14.78	0.93	10.02	−16.68	−3.86	−3.11	10.19	0.93	10.02	−13.07	−3.86	−3.11	8.39
Aldrin	5.82	15.54	9.68	−14.71	4.01	−13.13	5.16	5.22	4.75	5.21	5.61	−4.21	4.21
Thiamethoxam	12.63	7.18	9.26	5.34	3.83	−10.05	13.95	7.97	2.24	13.55	4.58	−13.15	10.21
Pendimethalin	19.34	5.77	8.73	−5.27	9.60	−11.24	3.76	7.19	3.61	17.76	−8.05	4.22	4.62
Cyprodinil	14.50	12.52	9.42	−0.27	7.67	−5.90	12.91	8.44	12.54	2.19	7.03	4.46	5.30
Tolyfluanid	18.26	6.96	12.47	6.83	8.72	−6.64	4.27	6.96	14.03	−11.24	−9.00	−0.71	13.21
Fludioxonil	15.70	9.60	11.62	−1.55	1.78	−3.15	7.02	4.42	1.17	14.85	6.95	−4.39	7.79
Dieldrin	15.27	14.88	15.00	−1.28	−10.15	0.06	5.07	2.56	4.12	−1.73	−9.44	7.38	3.06
Endrin	19.07	6.66	14.65	−10.02	−0.14	8.80	19.07	6.66	2.73	−5.89	−3.59	−10.95	13.38
o,p'-DDT	17.15	10.70	2.63	−0.38	11.31	−0.51	9.17	2.97	2.95	−7.80	−14.75	14.22	2.36
Fenhexamid	35.54	13.92	32.70	−6.87	−1.21	−7.96	5.97	9.59	6.48	1.41	54.67	19.54	10.23
Acetamiprid	8.44	13.59	7.94	−10.12	4.74	−5.27	5.55	7.33	13.97	58.65	3.93	−12.60	11.50
Methoxychlor	19.43	15.01	14.28	7.43	−4.65	1.70	18.30	5.82	4.58	3.62	−5.00	8.47	3.23
Estrone	4.05	12.25	8.38	−2.49	8.50	−11.81	6.22	3.02	7.18	−15.07	10.76	9.81	5.06
Estradiol	7.15	14.86	15.03	−2.76	11.08	−11.33	7.97	2.29	8.36	−10.43	−14.60	−6.49	14.14
Azoxystrobin	15.24	4.97	13.26	−4.74	9.62	−6.33	15.49	5.56	13.26	0.68	−5.94	10.33	12.29

day tests, suggesting that additional tests were need for these compounds.

The data obtained from the repeatability studies of the instrumental precision ranged between 1.33% and 14.95%, with a mean value of 7.58 and a standard deviation of 4.21 which was considered acceptable given the limit of 15% set by the chromatographic methods validation rules for intra-day precision.

4.4.4. Recovery

The experimental mean concentrations ($n \geq 3$) for three levels of calibration and related recoveries are shown in Table 4.

A paired comparison between the theoretical or nominal concentrations and experimental concentrations showed no statistical difference ($p > 0.05$) by applying the Student's *t*-test at 95% confidence level, which confirms the accuracy of the method [63].

The mean recovery of the method was 101.01% and the standard deviation of the mean recovery of each fortification level was 0.96%.

The statistical treatment of the recovery test was also performed by applying the Student's *t*-test, and the *t*-value calculated from experimental data was 1.81, inferior to the tabulated value 2.92, with 95% confidence and $n - 1$ degrees freedom. It is accepted, therefore, the null hypothesis proposed.

Method recovery was also assessed by the recovery values obtained from the quality control internal standard (atrazine- d_5), whose dispersion is important to evaluate the extraction efficiency [70] (Fig. 5).

The mean recovery and standard deviation in a total of 29 tests was $90.74 \pm 12.08\%$ with a CV of 13.31%. The control limits established are set between 70% and 120%, with $CV \leq 20\%$ according to SANCO [29].

4.4.5. Stability

Once the environmental waters were always been processed within 24 h after sampling, the stability studies

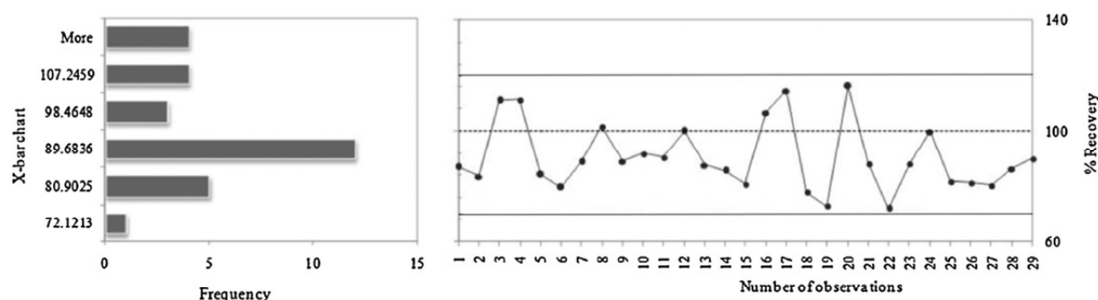


Fig. 5. Histogram and control chart of the percentage of recovery of atrazine- d_5 added to calibration standards and samples.

Table 4
Mean values of the experimental concentrations and recoveries for each concentration level ($n \geq 3$).

EDCs/pesticides Nominal conc. ($\mu\text{g/L}$)	Exp. Conc. ($\mu\text{g/L}$)			% Recovery		
	15	90	360	15	90	360
EPTC	15.66	102.40	368.00	104.39	113.78	102.22
Folpet	14.62	84.31	353.34	97.48	93.68	98.15
Phosmet	15.36	91.08	358.42	102.43	101.20	99.56
2,4-D	15.18	88.14	366.65	101.17	97.93	101.85
Atrazine-desethyl	15.08	87.44	369.62	100.54	97.15	102.67
Terbutylazine-desethyl	15.11	85.33	363.82	100.72	94.81	101.06
Iprodione	15.40	90.19	355.84	102.66	100.21	98.84
Dimethoate	15.05	86.86	362.93	100.33	96.52	100.81
Atrazine	15.30	84.47	365.97	102.01	93.86	101.66
Cyromazine	15.75	89.18	358.95	105.00	99.09	99.71
Terbutylazine	15.00	86.36	361.20	99.97	95.96	100.33
Pirimicarb	14.96	89.29	361.55	99.72	99.21	100.43
Alachlor	15.06	94.31	360.08	100.39	104.79	100.02
Metalaxyl	14.93	88.78	360.24	99.53	98.64	100.07
Linuron	15.94	93.57	358.16	106.25	103.96	99.49
S-Metolachlor	17.50	93.48	371.20	116.68	103.86	103.11
Aldrin	14.59	88.87	375.17	97.30	98.75	104.21
Thiamethoxam	14.82	90.57	355.26	98.77	100.63	98.68
Pendimethalin	15.79	94.10	365.16	105.27	104.55	101.43
Cyprodinil	15.04	91.29	361.66	100.27	101.43	100.46
Tolyfluanid	15.28	89.65	361.84	101.86	99.61	100.51
Fludioxonil	15.23	91.42	356.49	101.55	101.58	99.02
Dieldrin	15.21	95.39	359.78	101.38	105.99	99.94
Endrin	16.50	90.13	356.60	110.02	100.14	99.06
o,p'-DDT	15.06	94.48	361.83	100.38	104.98	100.51
Fenhexamid	16.03	91.09	357.80	106.87	101.21	99.39
Acetamiprid	14.37	90.24	360.53	95.79	100.27	100.15
Methoxychlor	15.22	94.50	354.12	101.50	105.00	98.37
Estrone	15.42	90.26	359.66	102.79	100.29	99.91
Estradiol	15.35	88.72	364.32	102.33	98.58	101.20
Azoxystrobin	15.03	89.27	353.77	100.19	99.19	98.27
Mean	15.32	90.49	361.29	102.11	100.54	100.36
Standard deviation	0.60	3.68	5.22	3.98	4.09	1.45

have not yet been carried out following the recommendations.

The stability of the calibration standards prepared in methanol and stored at 4 °C was evaluated by its periodic analysis for more than 3 months, with an averaged CV $\leq 15\%$. Stability was confirmed for all compounds except for folpet, whose degradation became evident 1 month after preparation.

4.4.6. Robustness

As temperatures and flow-rates were kept constant, robustness was assessed by testing two different columns from Varian (VF-5 MS 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) and a column from Teknokroma (TRB-5MS 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), without any observed discrepancy of the chromatographic data.

In addition, different lots of SPE cartridges (K91353212 and K91328612) and solvents were tested during the validation procedure and no differences were founded regarding the obtained results.

5. Conclusions

The results showed that the developed methodology SPE/GC–MS could be established as a suitable protocol for the simultaneous screening of ultra-trace levels of 31 EDCs and other pesticides in water.

The optimization of the extraction, purification, concentration and chromatographic methodologies, coupled with the high sensitivity and selectivity inherent to the detector, allowed the identification and quantification of the compounds of interest at concentrations below those reported in national and international legislation.

To avoid and minimize any ambiguity related to the matrix-induced enhancement effect, calibration curves for all quantification purposes were generated from matrix-matched standards and instrumental conditions in the SIM mode showed excellent linear responses for the studied analytes.

As the assumption of homoscedasticity was not satisfied, leading to improper estimation and inference in the statistical quantification model, a weighted least squares calibration procedure was applied revealing useful improvements in accuracy, particularly at the lower end of the range where percentage bias was considerably greater than the acceptable limits of $\pm 20\%$ when simple least squares regression was used.

Although weighted least squares regression is more complex and laborious than ordinary linear regression, involving the use of additional statistical tests and mathematical operations, it should be performed in order to obtain more realistic results and lower limits of quantification.

Good reproducibility and high sensitivity were obtained and the method was considered efficient, precise and accurate for all analytes in accordance with the suggested standards of acceptance, providing a good possibility of simultaneous screening for a large number of hazardous compounds in cases of suspected water poisoning.

Acknowledgement

One of the authors (A. Melo) wishes to thank FCT the grant SFRH/BD/41764/2007.

References

- [1] C.R. Propper, Integr. Comp. Biol. 45 (2005) 19.
- [2] F.J.R. Paumgarten, Cadernos Saúde Pública 18 (2002) 354.

- [3] SEC (2007) 1635, Community Strategy for Endocrine Disruptors (working document), Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, 2007.
- [4] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, J. Sep. Sci. 26 (2003) 105.
- [5] COM (1999) 706 final CEC – Commission of the European Communities, 1999.
- [6] J.G. Dorea, Sci. Total Environ. 400 (2008) 93.
- [7] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Control of water pollution from agriculture – FAO irrigation and drainage paper 55, 1996.
- [8] J.O. Sumpter, Acta Hydrochim. Hydrobiol. 33 (2005) 9.
- [9] V. Domingues, A. Alves, M. Cabral, C. Delerue-Matos, J. Chromatogr. A 1069 (2005) 127.
- [10] V.E. Domingues, G. Priolo, A.C. Alves, M.E. Cabral, C. Delerue-Matos, J. Environ. Sci. Health Part B: Pestic. Contam. Agric. Wastes 42 (2007) 649.
- [11] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, Mass Spectrom. Rev. 25 (2006) 838.
- [12] L. Viglino, K. Aboufadi, M. Prevost, S. Sauve, Talanta 76 (2008) 1088.
- [13] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 85.
- [14] A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 79.
- [15] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 179.
- [16] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, Chromatographia 59 (2004) 419.
- [17] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Anal. Chim. Acta 76 (2004) 704.
- [18] H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 122.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions, Approved guideline, third ed., C24-A3, 2006.
- [20] A Guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme, Genève, Switzerland, 2005.
- [21] European Community, Brussels, EU-Decision 2455/2001/EC of November 20, that amends the Directive 200/60/EC, Official Journal of European Communities, L331/1, 2001.
- [22] Environmental Protection Agency [EPA–HQ–OPPT–2004–0109; FRL–8399–7]. Final List of Initial Pesticide Active Ingredients and Pesticide Inert Ingredients to be Screened Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 2004.
- [23] ERSAR, Pesticidas a pesquisar em 2010 em águas para consumo humano, 2009.
- [24] International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Methods Definitions and Terminology, Q2A Guideline, 1994.
- [25] International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95) Q2B, 1995.
- [26] International Conference on Harmonisation (ICH), Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.
- [27] V.P. Shah, Aaps J. 9 (2007) E43.
- [28] SANCO/825/00 rev.7 (17/03/2004), 2004.
- [29] SANCO/10684/2009 (01/01/2010), 2009.
- [30] Food and Drug Administration (FDA), 2001.
- [31] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Approved Guideline, C43-A, Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Confirmation of Drugs, 2002.
- [32] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Approved Guideline, EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, 2004.
- [33] EURACHEM, Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.
- [34] EURACHEM/CITAC, Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2000.
- [35] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 835.
- [36] ISO/IEC 17025:1999, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, 1999.
- [37] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE n° 899, de 29/05/2003, 2003.
- [38] Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [39] A.M. Almeida, M.M. Castel-Branco, A.C. Falcão, J. Chromatogr. B 774 (2002) 215.
- [40] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I. Jardim, L.F.C. Melo, Quim. Nova 27 (2004) 771.
- [41] R. Causon, J. Chromatogr. B 689 (1997) 175.
- [42] F. Bressolle, M. Bromet-Petit, M. Audran, J. Chromatogr. B 686 (1996) 3.
- [43] N.M. Cassiano, J.C. Barreiro, L.R.R. Martins, R.V. Oliveira, Q.B. Cass, Quim. Nova 32 (2009) 1021.
- [44] G. Zhou, Z.R. Tan, D.S. Ouyang, Y. Chen, D. Guo, H.T. Xie, Y.Z. Liu, L. Fan, H.W. Deng, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 37 (2010) 501.
- [45] B. Kanrar, S. Mandal, A. Bhattacharyya, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1926.
- [46] N.V. Nagaraja, J.K. Paliwal, R.C. Gupta, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 433.
- [47] A.G. Asuero, G. Gonzalez, Crit. Rev. Anal. Chem. 37 (2007) 143.
- [48] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson Education Limited, 2005.
- [49] U.S. Commerce Department, Engineering Statistics Handbook, NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, 2003.
- [50] E. Rogatsky, D. Stein, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 1757.
- [51] D.R. Erney, T.M. Pawlowski, C.F. Poole, HRC-J. High Resolut. Chromatogr. 20 (1997) 375.
- [52] C.F. Poole, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 241.
- [53] R.M. Gonzalez-Rodriguez, R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara, J. Chromatogr. A 1196 (2008) 100.
- [54] J. Zrostikova, J. Hajslova, M. Godula, K. Mastovska, J. Chromatogr. A 937 (2001) 73.
- [55] G.A. Shabir, J. Chromatogr. A 987 (2003) 57.
- [56] FAO/WHO Food standard, Codex alimentarius, 2009.
- [57] J. Vessman, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D.T. Burns, A. Fajgelj, H. Muller, Pure Appl. Chem. 73 (2001) 1381.
- [58] A.M. Committee, Analyst 113 (1988) 1469.
- [59] M. Mulholland, D.B. Hibbert, J. Chromatogr. A 762 (1997) 73.
- [60] International Standard Organization ISO 8466-1:1990. Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, 1990.
- [61] A.M. Committee, Analyst 119 (1994) 2363.
- [62] A. Francisco, Ph.D. Thesis, FFUC, 2008.
- [63] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, J. Pharm. Sci. 81 (1992) 309.
- [64] C. Hartmann, D.L. Massart, R.D. McDowall, J. Pharm. Biomed. Anal. 12 (1994) 1337.
- [65] International Organization Standardization ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions, 1994.
- [66] International Organization Standardization ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, 1994.
- [67] International Organization Standardization ISO 5725-3:1994/Cor 1:2001, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method, 2001.
- [68] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, R.D. McDowall, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 193.
- [69] A.B.G. Abreu, M.H.R. Matta, E. Montagner, Quím. Nova 31 (2008) 5.
- [70] J.W. Hooper, Bioanalytical Validation—A North American View (1995) 347.
- [71] H.T. Karnes, C. March, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 911.
- [72] Commission Directive 2002/63/EC of 11 July, 2002.
- [73] R.L. Gomes, J.W. Birkett, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Int. J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 1.
- [74] G.G. Ying, R.S. Kookana, Y.J. Ru, Environ. Int. 28 (2002) 545.
- [75] L.G. Lopes, Ph.D. Thesis, Instituto de Química UNESP—Araraquara, 2006.
- [76] Council Directive 98/83/EC of 3 November on the Quality of Water intended for Human Consumption, Official Journal of the European Communities, 1998.

Capítulo 3

**Optimisation of a solid-phase
microextraction/HPLC/Diode Array method for
multiple pesticide screening in lettuce**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce

Armindo Melo ^{a,e}, Ana Aguiar ^{b,e}, Catarina Mansilha ^{c,e}, Olívia Pinho ^{d,e}, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira ^{a,e,*}^a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal^b Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal^c Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal^d Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto, Portugal^e Requimte, Universidade do Porto, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2010

Received in revised form 4 May 2011

Accepted 31 July 2011

Available online 16 August 2011

Keywords:

Pesticides

Lettuce

Quantitative methods

Response surface methodology

ABSTRACT

A new method was developed for the determination of 10 pesticides widely used in lettuce production (acetamiprid, azoxystrobin, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, metalaxyl, pirimicarb, and tolyfluanid) using solid-phase microextraction (SPME) and liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD). The extraction performance of four different SPME coatings, polydimethylsiloxane (PDMS), PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB), carbowax/templated resin (CW/TPR), and polyacrylate (PA) was evaluated using an interface SPME–HPLC. CW/TPR fibre was selected as the most appropriate for the extraction of majority of these pesticides. Three variables (pH, NaCl% and extraction time) were considered key factors in the optimisation process. Interactions between these analytical factors and their optimal levels were investigated by response surface methodology based on central composite design. The method allowed the determination of azoxystrobin, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, and tolyfluanid in lettuce at concentrations between 0.8 and 25.6 mg/kg, i.e., below the maximum residues levels allowed for those compounds in lettuce. Lettuce samples that suffered pesticide treatments with folpet and fenhexamid were analysed during days to harvest to study the dissipation behaviour of the pesticides used. Concentration of folpet was 92.8; 53.4; 22.9; 17.9; 7.45; 1.85 mg/kg and concentration of fenhexamid was 158.1; 76.2; 31.0; 27.3; 7.24; 0.87 mg/kg, respectively for t_0 , t_1 , t_3 , t_6 , t_7 , t_9 days, and not detected at t_{14} days for the two pesticides.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticides are potentially harmful to the environment and consequently to human beings not only by direct contact but also through the consumption of pesticide contaminated food and water. The European Community established maximum residue levels (MRLs) based on the assumption that good agricultural practice is applied at the use of pesticides in farming (Regulation (EC) No. 396/2005).

Governmental legislation demands an increasing number of pesticides to be included in the monitoring programmes (Directive 2009/128/EC). This forces the laboratories to look for effective methods capable of screening an increasing number of pesticides. Thus, the application of multiresidue methods for pesticides determination in foodstuff is normally preferred in most laboratories due to the simplicity of determining several pesticides after a

single extraction, facilitating the demands of more efficient and rapid monitoring.

Analysis of pesticides in vegetables has for many years been performed by use of gas chromatography (GC) especially coupled with nitrogen phosphorus detector (NPD), electron capture detector (ECD) (Fernández, Picó, & Manes, 2002; Tadeo, Sánchez-Brunete, Albero, & González, 2004) and mass spectrometry (MS) (Beyer & Biziuk, 2008; Ferrer, Garcia-Reyes, Mezcuca, Thurman, & Fernandez-Alba, 2005; Kaihara, Yoshii, Tsumura, Ishimitsu, & Tonogai, 2002; Sánchez-Brunete, Albero, Martín, & Tadeo, 2005; Stajnbaher & Zupancic-Kralj, 2003) or MS/MS (Granby, Andersen, & Christensen, 2004; Hiemstra & de Kok, 2007; Ortelli, Edler, & Corvi, 2004; Sagratini, Manes, Giardina, Damiani, & Pico, 2007; Sannino, Bolzoni, & Bandini, 2004; Soler, Manes, & Picó, 2004). However, high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to other less powerful detectors, that are, however, easier to acquire and use (Kaihara et al., 2000; Martínez-Galera, Lopez-López, Gil-García, & Martínez-Vidal, 2001; Paíga, Morais, Correia, Delerue-Matos, & Alves, 2009) is useful and preferable for polar, low volatile and/or thermolabile compounds that are not directly determinable by GC.

* Corresponding author at: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal. Fax: +351 222003977.

E-mail address: isabel.ferreira@ff.up.pt (I.M.P.L.V.O. Ferreira).

Analysis of trace levels of pesticides in foodstuff frequently requires extensive extraction and purification procedures to remove high molecular weight interfering compounds such as lipids (Ridway, Lalljie, & Smith, 2007). The extraction process often involves sample preparation, such as, chopping and maceration followed by solvent extraction. Nowadays, extraction methods include solid-phase extraction (Stajnbaher & Zupancic-Kralj, 2003), supercritical fluid extraction (Kaihara et al., 2000), solid-phase microextraction (SPME) (Aulakh, Malik, Kaur, & Schmitt-Kopplin, 2005; Hu et al., 2008), stir bar sorptive extraction (Sandra, Tienpont, & David, 2003) and more recently the 'quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe' (QuEChERS) method (Cunha, Lehotay, Mastovska, Fernandes, & Oliveira, 2007) and matrix solid-phase dispersion (Covaci et al., 2010).

Solid-phase microextraction was introduced and developed by Pawliszyn (Arthur & Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1997). The technique is based on the partition of the analyte between the sample matrix and a stationary phase that is a fibre coated with an extracting liquid (polymer) or solid (sorbent) phase. Equilibrium is reached between the concentration of the analyte in sample and the amount of analyte sorbed on the fiber, depending on the distribution coefficient. Owing to its convenience, solvent-free operation and low cost, it has gained wide applicability as an analytical technique. To date, SPME coupled with GC has been widely investigated for the analysis of volatile organic compounds including some pesticides (Rodrigues, Reyes, Rehder, & Rath, 2005; Sanchez-Palomo, Diaz-Maroto, & Perez-Coello, 2005). Moreover, SPME coupled with HPLC is receiving increased attention concerning the analysis of non- or semi-volatile, or thermally unstable compounds. Recently, the analysis of pesticides by SPME–HPLC has been reviewed by Aulakh et al. (2005). However, in general the optimised methodologies are applied only to water and biological samples, analyses of pesticides residues in vegetables and fruits are still scarce (Aulakh et al., 2005; Falqui-Cao, Wang, Urruty, Pommier, & Montury, 2001; Wang, Hennion, Urruty, & Montury, 2000). Pesticides use and its residues on lettuce are of particular food safety interest. Lettuce is consumed fresh, so residues that may remain on the harvested product are not removed by processing. Pesticide residues are detected in lettuce and other leafy vegetables more often than in other fresh vegetables. Moreover, lettuce is a major fresh-market vegetable crop (Vandeman, Shank, Chandran, & Vasavada, 1992). The massiveness of the lettuce in European fresh markets is produced in greenhouses where the conditions are favourable to plant growth. However greenhouse mild temperatures and high humidity also promotes fungal and insect development. Key pests in lettuce are the diseases downy mildew and *Botrytis* grey mould and the insects' aphids. Growers prevent these pests using authorised pesticides. In EU the most used pesticides in lettuce are azoxystrobin, acetamiprid, cyprodinil, fenehexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, metalaxyl, pirimicarb, and tolyfluanid so they were used in this conduct experiment. To our knowledge, no study has been presented describing the use of SPME and HPLC–DAD for the simultaneous analysis of these pesticides (both fungicides and insecticides) in vegetables.

The development of a SPME–HPLC method requires selection of many variables (fibre type, extraction time, desorption solvent, soaking time, desorption time, extraction temperature, pH of sample solution, and ionic strength) in order to establish optimum conditions. The conventional approach for the optimisation of a multivariable system is usually one-variable-at-a-time. This can be very time consuming and, where interactions exist between the variables, it is unlikely to find the true optimum. Response surface methodology (RSM) is a very useful tool for this purpose as it provides statistical models, which help in understanding the interactions among the parameters that should be optimised (Leardi, 2009). RSM is a collection of mathematical and statistical

techniques for modelling and analysis of problems in which a response of interest is influenced by several variables (Ferreira et al., 2007). The main objective of RSM is to determine the optimum operational conditions for the system or to determine a region that satisfies the operating specifications (Ferreira et al., 2007). RSM can be a useful tool for optimisation in analytical chemistry (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008), namely applied to the optimisation of pesticides by SPME (Ferré, Borrell, & Marcé, 1999).

The purpose of this study was the development and validation of a SPME/HPLC–DAD method for multiple pesticide screening in lettuce (*Lactuca sativa*). RSM based on central composite design was used to optimise some variables in SPME. The method was applied to the monitorization of pesticides in greenhouse-grown lettuce samples to study the dissipation behaviour of some of these pesticides during the days to harvest, aiming to evaluate the use of good agricultural practices.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

All analytical-grade chemicals (purity >98%) including acetamiprid, azoxystrobin, cyprodinil, fenehexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, metalaxyl, pirimicarb, tolyfluanid, and phosmet (used as internal standard) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). All the solvents used were HPLC-grade from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water (0.054 $\mu\text{S}/\text{cm}$) was obtained by using a Milli-Q system from Millipore (Milford, MA, USA).

Pesticides standards and calibration solutions were prepared as recommended by SANCO/10684/2009. Stock standards of each pesticide were prepared in acetonitrile and kept from light in a freezer. Working solutions of each pesticide were mixtures of appropriate concentrations prepared weekly and kept at low temperature in the dark.

Different buffers for pH (ranging between 2.64 and 9.36) were prepared to study the effect of pH on SPME pesticide extraction (Perrin & Dempsey, 1974). Buffer with pH 8 selected for analysis of real samples contained 50 mL 0.1 M KH_2PO_4 and 46.1 mL NaOH diluted to 100 mL (Perrin & Dempsey, 1974).

2.2. Sampling strategy

Lettuces (*L. sativa* L. var. *capitata*) were planted in a 300 m² plastic greenhouse situated in Póvoa de Varzim, in December 2008. Planting density was 12 plants/m² (30 cm \times 25 cm). The culture was irrigated whenever necessary with a total of 150 L/m². Pesticides were sprayed when decided by grower according to the results of risk assessment for the main pests and diseases. Lettuce plants (1 kg or at least 10 units, depending on the growth phase) were collected before the addition of pesticides (pesticide free samples) and at 0, 1, 3, 6, 7, 9 and 14 days after pesticide addition, respectively t_0 , t_1 , t_3 , t_6 , t_7 , t_9 , t_{14} to study the dissipation behaviour of some of these pesticides after pre-harvest interval in accordance with Directive 2002/63/EC and SANCO/10684/2009. Lettuce samples were immediately transported to the laboratory, freeze for 2 h and mashed with a blender.

2.3. HPLC–DAD conditions

The chromatographic analysis was carried out in an analytical HPLC unit (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with Jasco PU-1580 HPLC pumps, a Column Heater (Model 7981; Jones Chromatography, Hengoed, UK), an MD-910 Plus multiwavelength detector. The

SPME–HPLC interface with Rheodyne valve (Supelco, USA) was used to perform the injection in HPLC system. The column was a reversed-phase Ultracarb ODS (30) C18 (5 µm, 250 mm 4.6 mm) (Phenomenex, Milford, MA, USA). The Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France) was also used. The HPLC was carried out by gradient elution with a mixture of two solvents and a flow of 0.75 mL/min. Solvent A consisted of 0.1% of trifluoroacetic acid in water and solvent B consisted of methanol. The linear gradient program was 0–7.5 min, 20–60% B in A, 7.5–11.5 min, 60% of B in A; 11.5–16.5 min, 60–69% of B in A, 16.5–25 min, 69–85% B in A; 25–45 min, column rinse and re-equilibration. Separations were carried out at 40 °C of temperature. Diode Array detection was set at 224 nm. Peak identification in samples was carried out by comparing retention times and spectra of unknown peaks with reference standards, as well peak purity.

2.4. Selection of SPME fibre and desorption conditions

The SPME device for manual extraction, consisting in a holder assembly and several replaceable fibers, was purchased from Supelco (Madrid, Spain) and used without modification. The fibre coatings assayed in this work were: PDMS (100 µm), PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB, 60 µm), carbowax/templated resin (CW/TPR, 50 µm), and polyacrylate (PA, 85 µm). Each fibre was conditioned in methanol with stirring for 30 min. Assays for selection of SPME fibre were performed by direct immersion of the fibre into 4.0 mL of a standard solution containing 1 µg/mL of each pesticide under study in acetonitrile:water (10:90). For preliminary experiments, extraction was carried out at room temperature (22 ± 3 °C approx.) for 30 min (agitation at 1000 rpm), 1200 mg of sodium chloride were added (30% w/v). The desorption chamber of the interface SPME–HPLC (60 µL) was previously filled with a solution of methanol:water (9:1). Afterwards, and in order to select the appropriate desorption solvent and soaking time other experiments were developed with the selected fibre using methanol, and mixtures of methanol:water (9:1) and (8:2) and soakings times of 5, 10 and 15 min.

2.5. Statistical design of experiments for SPME extraction

Experiments with three independent variables pH (X_1), NaCl% (X_2) and extraction time (X_3) were conducted using CW/TPR SPME fiber, desorption with methanol:water (9:1) in 10 min following the experimental design obtained by the full factorial Central Composite Design (CCD). In this study, the full CCD consisted of (i) a complete 2^3 -factorial design, (ii) n_0 , centre point ($n_0 > 1$) and (iii) two axial points on the axis of each design variable at a distance of $\alpha = 1.682$ from the design center. Hence a total number of design points of $N = 2^k + 2k + n_0$ was used. The centre point was replicated six times to give five degrees of freedom for calculation of errors in the experiments. The response Y was the sum of peak area of all pesticides, since it grouped information from all compounds under study. The optimal values of response Y were obtained by solving the regression equation and by analysing the response surface contour plots. The variables were coded according to the Eq. (1):

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \quad (1)$$

where, X_i is the coded value of variable i , x_i the uncoded real value of an independent variable, x_0 the value of X_i at the centre point and Δx is the step change between levels 0 and 1. The behaviour of the system was explained by the following second order polynomial equation (Eq. (2)):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i,j=1(i \neq j)}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

where, Y is the sum of peak area of all pesticides under study, β_0 the constant coefficient, β_i the coefficient of linear effect, β_{ii} the coefficient of squared effect, β_{ij} the coefficient of interaction effect and X_j is the coded value of variable j .

The goodness-of-fit of the regression model and the significance of parameters estimates were determined through appropriate statistical methods. Work on experimental design, data analysis, response surfaces and contour diagrams, was performed by Design Expert trial-Version 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

Descriptive statistics, analyses of variance and multiple linear regressions were all performed with SPSS for Windows, v. 17.0 (SPSS, Chicago IL, USA).

2.6. SPME method validation and application to real samples

The limit of quantification (LQ) is assumed to be the lowest amount of an analyte in a sample that can be quantified with acceptable precision and accuracy whereas the limit of detection (LD) is the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from the background noise but not necessarily quantified as an exact value. Both were calculated through the calibration curve parameters, using the intercept and the residual standard deviation obtained for the calibration line (Ferré et al., 1999; Miller & Miller, 2005).

Eight-point calibration curves were constructed for each pesticide using lettuce pesticide free samples fortified within the range of concentrations of 0.8–25.6 mg/kg. Phosmet was chosen as internal standard (IS) because its use is forbidden in European Union lettuce crops.

Analyses of real samples were performed as follows: before SPME extraction, 2.5 g of lettuce mashed samples added of phosmet (10 µL of a 300 mg/L acetonitrile solution) were sonicated for 10 min at ±40 °C with 1 mL of acetonitrile in an ultrasonic bath, followed by centrifugation (10 min, 11.5 g).

Optimal SPME conditions for the extraction of the pesticides were: 2 mL aliquot of lettuce extract, 0.7 g of NaCl (18% w/v) and 2 mL of buffer solution (pH = 8) were transferred to a 4-mL Teflon-lined septum cap vial equipped with a magnetic bar. The CW/TPR SPME fibre was immersed directly into the sample solution and the extraction took place at room temperature (22 ± 3 °C approx.) for 30 min with continuous stirring at 1000 rpm. After extraction, the fibre was withdrawn into the needle, the needle was removed from the septum and was inserted in the desorption chamber of the interface SPME–HPLC (with Rheodyne valve) that is off-line under ambient pressure when the injection valve is in load position. The chamber (60 µL) was previously filled with a solution of methanol:water (9:1) and the fibre was soaked for 10 min (soaking time). Then, the valve was switched to inject position and the analytes were delivered to the column. The valve was returned to load position after 1 min (desorption time). Between extractions the fibre was cleaned with methanol and ultrapure water for 10 min.

3. Results and discussion

3.1. HPLC–DAD conditions

The mobile phase containing 0.1% trifluoroacetic acid in water and methanol was selected since it is not very expensive and keeps a constant acid pH that is important to improve peak resolution. Thus, after optimisation of gradient the chromatographic separation of 11 pesticides (10 pesticides under study and IS) was carried

out with a mixture of these two solvents using a flow of 0.75 mL/min. The gradient conditions described in (Section 2.3) were adapted from Otero, Grande, and Gándara (2003) for separation of all target compounds, advantages of the purposed gradient conditions are shorter running time and the use of more economic solvents.

3.2. Selection of SPME fibre and desorption conditions

PDMS, PDMS/DVB, PA, and CW/TPR fibres were tested using the conditions described in Section 2. Among the four fibres tested, CW/TPR showed the best extraction performance for most of the pesticides, which is in agreement with results reported by other authors (Sagrati et al., 2007). However, acetamiprid was not extracted, owing to its very low value of log *P* (0.80), additionally, pirimicarb and metalaxyl presented low peak areas also expected since these two pesticides have low octanol/water partition coefficients as well (log *P* = 1.70 and 1.65, respectively) and thus they present a low affinity for the SPME coating (Ridway et al., 2007). All other pesticides under study present log *P* > 2 and high affinity for the SPME coating. As a result, CW-TPR fibre was

selected for subsequent experiments. Afterwards, and in order to select the appropriate desorption solvent and soaking time preliminary experiments were developed with the CW-TPR fibre using methanol, and mixtures of methanol/water (9:1) and (8:2) and soaking times of 5, 10 and 15 min. Best desorption was obtained using methanol/water (9:1) and 10 min of soaking (data not shown).

3.3. Statistical design of experiments for SPME extraction

To evaluate the sum of peak area of all pesticides (*Y*) 20 experiments were conducted according to the CCD method. The design of this experiment is given in Table 1, together with the experimental results and predicted values. To study the combined effects of pH (*X*₁), NaCl% (*X*₂) and extraction time (*X*₃), experiments were performed at different combinations of these parameters using statistically designed experiments. Six experiments (runs 15–20) were replicated at the centre point to verify any change in the estimation procedure as a measure of the precision property.

Regression analysis was performed to fit the response function (*Y*). The model expressed by Eq. (2), where the variables take their coded values, represents the sum of peak area of all pesticides (*Y*) as a function of *X*₁, *X*₂ and *X*₃. The final empirical model in terms of coded factors for the sum of peak area (*Y*) is given in Eq. (3):

$$Y = 4937828 + 616242X_1 + 128691X_2 + 2150239X_3 + 336454X_1X_2 - 240209X_1X_3 + 756312X_2X_3 + 418302X_1^2 - 607327X_2^2 + 60133X_3^2 \quad (3)$$

This equation was used to predict the sum of peak area in Table 1. Apart from explaining the linear effects of pH, NaCl% and extraction time on the sum of peak area, the CCD approach described the quadratic and interaction effects of the parameters too. The relationship between observed and predicted sum of peak area showed that the plotted points cluster around a diagonal line, indicating good fitness of the model, since the values of *R*² and *R*_{adj}² were found to be 0.944 and 0.894, respectively.

ANOVA is important in determining the adequacy and significance of the quadratic model. The analyses were done by means of Fisher's 'F'-test. Generally the model *F*-value of 18.69 with a low probability 'P'-value indicates high significance of the regression model (Miller & Miller, 2005). From the ANOVA summary (Table 2), the model was found to be statistically significant (*P* < 0.01) at the 99% confidence level. *X*₁, *X*₃, *X*₂*X*₃, *X*₁², *X*₂² are significant model terms. The lack-of-fit term is non-significant as it is desired. The non-significant value of lack-of-fit (more than 0.05) showed that the quadratic model was valid for the present

Table 1
2³ full factorial CCD experimental design matrix, actual and the predicted results.

Standard	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	Sum of peak area (<i>Y</i>)	
				Observed	Predicted
1	−1	−1	−1	3.44E+06	2.78E+06
2	1	−1	−1	4.00E+06	3.76E+06
3	−1	1	−1	1.46E+06	8.50E+05
4	1	1	−1	3.45E+06	3.18E+06
5	−1	−1	1	6.46E+06	6.05E+06
6	1	−1	1	6.14E+06	6.07E+06
7	−1	1	1	7.57E+06	7.14E+06
8	1	1	1	8.53E+06	8.51E+06
9	−1.68179	0	0	4.10E+06	5.04E+06
10	1.68179	0	0	7.22E+06	7.25E+06
11	0	−1.68179	0	2.53E+06	3.03E+06
12	0	1.68179	0	2.99E+06	3.46E+06
13	0	0	−1.68179	7.87E+05	1.52E+06
14	0	0	1.68179	8.51E+06	8.75E+06
15	0	0	0	4.79E+06	4.94E+06
16	0	0	0	4.82E+06	4.94E+06
17	0	0	0	5.52E+06	4.94E+06
18	0	0	0	5.05E+06	4.94E+06
19	0	0	0	3.99E+06	4.94E+06
20	0	0	0	5.60E+06	4.94E+06

Variable coded levels: *X*₁ = pH, −1.682 (pH 2.64), −1 (pH 4), 0 (pH 6), 1 (pH 8), 1.682 (pH 9.36); *X*₂ = NaCl (% w/v), −1.682 (3.18%), −1 (10%), 0 (20%), 1 (30%), 1.682 (36.81%); *X*₃ = Extraction time, −1.682 (9.55 min), −1 (30 min), 0 (60 min), 1 (90 min), 1.682 (110.5 min).

Table 2
Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for sum of peak area.

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	<i>F</i> -value	Prob > <i>F</i>	Remarks
Model	8.32E+13	9	9.25E+12	18.73106	<0.0001	Significant
<i>X</i> ₁	4.84E+12	1	4.84E+12	9.805957	0.0107	Significant
<i>X</i> ₂	2.26E+11	1	2.26E+11	0.458032	0.5139	
<i>X</i> ₃	6.31E+13	1	6.31E+13	127.871	<0.0001	Significant
<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₂	9.06E+11	1	9.06E+11	1.833952	0.2055	
<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₃	4.62E+11	1	4.62E+11	0.934798	0.3564	
<i>X</i> ₂ <i>X</i> ₃	4.58E+12	1	4.58E+12	9.267003	0.0124	Significant
<i>X</i> ₁ ²	2.4E+12	1	2.4E+12	4.867477	0.0519	
<i>X</i> ₂ ²	5.15E+12	1	5.15E+12	10.43558	0.0090	Significant
<i>X</i> ₃ ²	6.76E+10	1	6.76E+10	0.136866	0.7191	
Residual	4.94E+12	10	4.94E+11			
Lack of fit	3.23E+12	5	6.47E+11	1.899471	0.2492	Not significant
Pure error	1.7E+12	5	3.41E+11	–		
Total	8.82E+13	19	–	–		

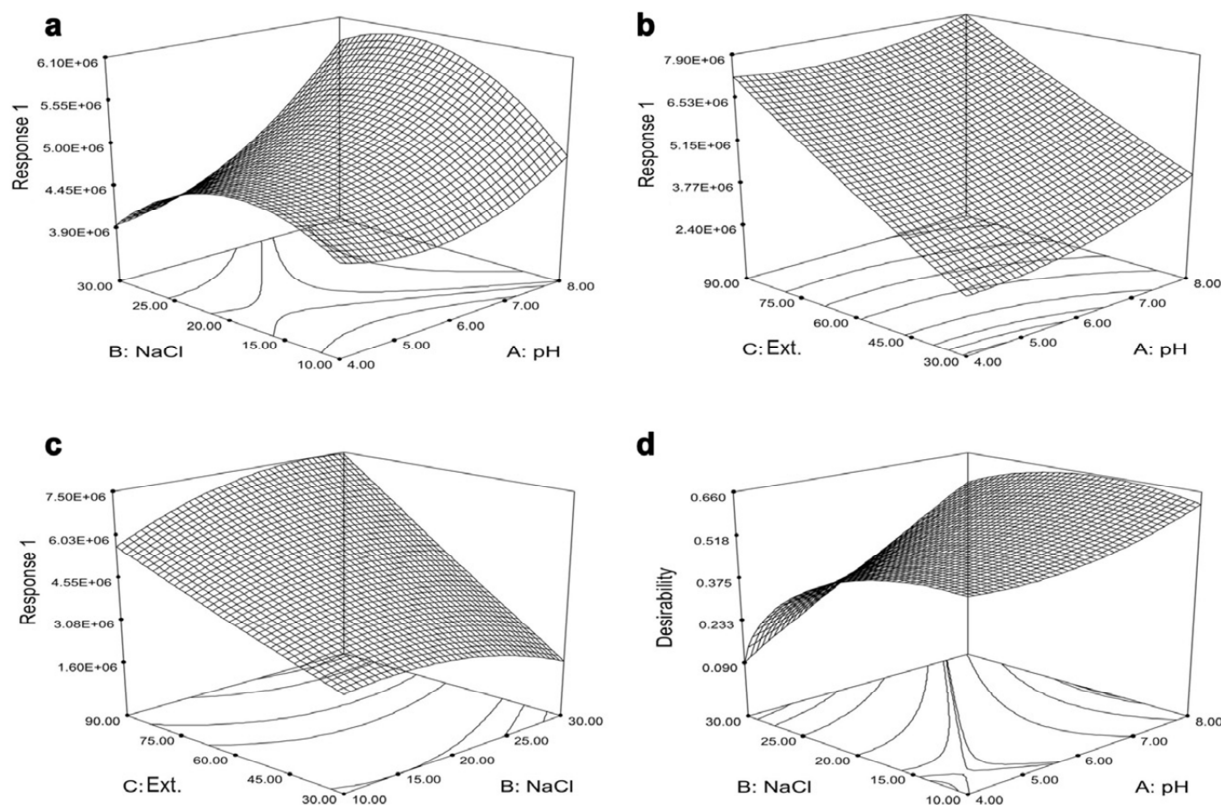


Fig. 1. (a) The combined effect of pH and NaCl percentage on the sum of peak area at constant extraction time (30 min); (b) The combined effect of pH and extraction time on the sum of peak area at constant percentage of NaCl (17.6%); (c) The combined effect of NaCl percentage and extraction time on the sum of peak area at constant pH (8); (d) The combined effect of pH and extraction time on the desirability at constant percentage of NaCl (17.6%).

study (Montgomery, 2001). Thus, the sum of peak area was adequately explained by the model equation (Eq. (3)).

To investigate the interactive effect of two factors on the sum of peak area, the response surface methodology was used and three dimensional and contour plots were drawn. The interferences so obtained are discussed: (i) the combined effect of pH and NaCl percentage is shown in Fig. 1a, the maximum response is obtained at pH 8 and between 15% and 20% NaCl; (ii) the combined effect of pH and extraction time is shown in Fig. 1b. Graphs show that the maximum sum of peaks area occurs under the maximum extraction time at pH 8; (iii) the combined effect of NaCl percentage and extraction time is shown in Fig. 1c. It is observed that for an extraction time of 30 min the higher response is observed between 15% and 20% NaCl and for 90 min extraction time higher response is obtained for 30% NaCl.

Design Expert allows the establishment of criteria for all variables, including factors and propagation of error. Assignment of optimisation parameters was performed to maximise response and minimise extraction time keeping the other parameters in the range. Desirability indices (di) were constructed combining the individual desirability's into single number and then searches the greatest overall desirability. Additionally, it was given higher relative importance to desirability of response and extraction time as a compromise between higher sensitivity with lower analysis time. The combined effect of pH and extraction time on desirability is shown in Fig. 1d. Graphs show a maximum desirability at 30 min and pH 8, keeping the percentage of NaCl at 17.6%.

Further to support the optimised data as given by numerical modelling under optimised condition, the confirmatory experiments were conducted with the parameters as suggested by the

model (X_1 (pH) 8, X_2 (NaCl%) 17.6% and X_3 (extraction time) 30 min). The response obtained (3.19×10^6) was within 95% prediction response interval ($2.27 \times 10^6 - 5.94 \times 10^6$) indicating a good accordance with the model given by RSM software.

3.4. Calibration and matrix effect evaluation

Lettuce has compounds that can interfere in the SPME of the selected pesticides. Thus, according to SANCO/10684/2009 the potential for matrix effects to occur should be assessed at method validation. For this purpose calibration curves were constructed using lettuce pesticide free samples (collected before the addition of any pesticide and analysed to confirm the absence of pesticides). Four different calibration curves were constructed using 0, 0.25, 1.0 and 2.5 g of lettuce, added of increasing amounts of pesticides. Calibration curves for each pesticide were prepared by plotting their area relative to that of the internal standard (phosmet) vs. the analyte concentration. Under the operational conditions detailed previously, the chromatographic separation achieved for lettuce samples proved to be lacking in interfering peaks that co-eluted with the pesticides studied (Fig. 2). Good linearity was observed for azoxystrobin, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, and tolyfluanid with r^2 greater than 0.996. Acetamiprid is not extracted using this SPME fiber, metalaxyl and pirimicarb were extracted only for concentrations above 20 mg/kg. Thus, owing to its low octanol/water partition coefficients (log P -value) alternative methods should be selected for these three compounds. Phosmet was a good choice as IS since it presented chromatographic characteristics similar to that of the compounds under study and presents an intermediary value of log P . Mean

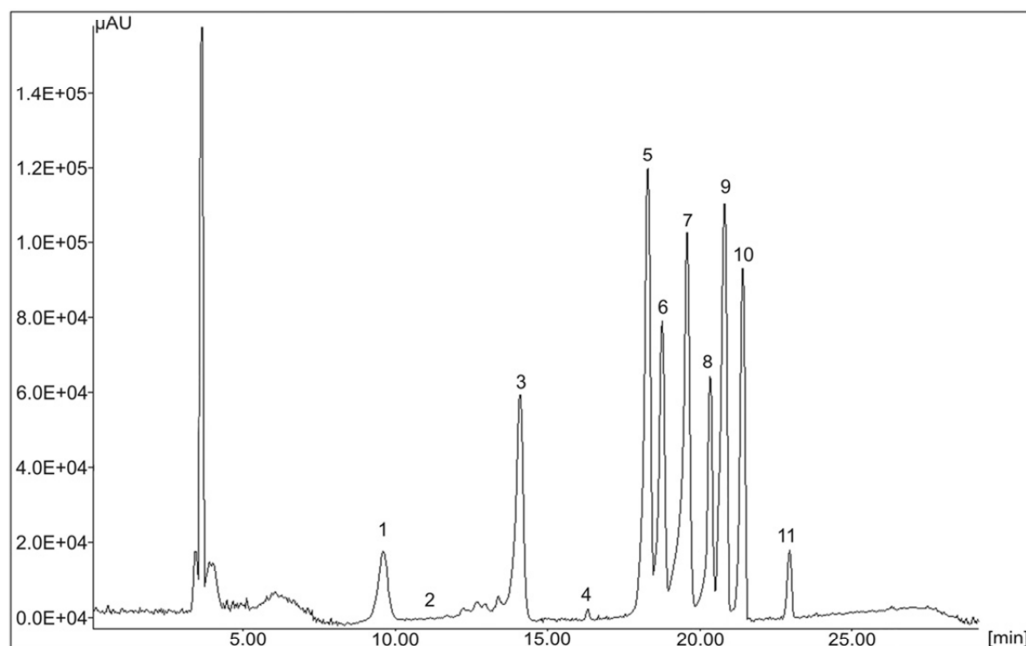


Fig. 2. Chromatograms of lettuce samples after SPME extraction under optimum extraction conditions (pH 8; 17.6% NaCl, 30 min extraction time): uncontaminated sample spiked with pesticides. Peak identification and concentration – 1: pirimicarb (56 mg/kg), 2: acetamiprid (56 mg/kg), 3: cyprodinil (5.6 mg/kg), 4: metalaxyl (56 mg/kg), 5: phosmet (8.4 mg/kg), 6: azoxystrobin (11.2 mg/kg), 7: fludioxonil (8.4 mg/kg), 8: fenhexamid (11.2 mg/kg), 9: folpet (8.4 mg/kg), 10: iprodione (22.4 mg/kg), and 11: tolyfluandil (22.4 mg/kg).

Table 3

Maximum residue levels (MRLs) for the pesticides under study, partition coefficients (K_{ow}), detection and quantification limits and calibration curve parameters: linear range tested for each pesticide, linearity [peak area = $bC + a$] and respective determination coefficients (r^2).

Pesticides	Family	EU's MRL (mg/kg) ^a	K_{ow} log P ^b	LD	LQ	Range of concentration tested (mg/kg)	$a \pm (95\%) \text{ CI}^c$	$b \pm (95\%) \text{ CI}^c$	r^2
Acetamiprid	Insecticide (nicotinoids)	5	0.80	–	–	–	–	–	–
Azoxystrobin	Fungicide (strobilurin)	3	2.50	0.48	1.59	1.6–12.8	0.057 ± 0.017	0.1363 ± 0.0021	0.9986
Cyprodinil	Fungicide (pyrimidines)	10	3.90	0.28	0.94	0.8–6.4	0.114 ± 0.004	0.059 ± 0.001	0.9980
Fenhexamid	Fungicide (hydroxanilide)	30	3.51	0.73	2.45	1.6–12.8	0.159 ± 0.024	0.124 ± 0.003	0.9967
Fludioxonil	Fungicide (pyroles)	10	4.12	0.37	1.24	1.2–9.6	0.150 ± 0.019	0.192 ± 0.003	0.9985
Folpet	Fungicide (phthalimide)	2	2.85	0.47	1.57	1.2–9.6	0.313 ± 0.042	0.341 ± 0.007	0.9976
Iprodione	Fungicide (dicarboximides)	10	3.10	1.54	5.14	3.2–25.6	0.263 ± 0.0323	0.0812 ± 0.002	0.9963
Metalaxyl	Fungicide (phenylamide)	2	1.65	–	–	–	–	–	–
Pirimicarb	Insecticide (carbamates)	1	1.70	–	–	–	–	–	–
Tolyfluandil	Fungicide (sulphamide)	10	3.90	1.53	5.10	3.2–25.6	0.0018 ± 0.019	0.048 ± 0.001	0.9964

LD, limit of detection (mg/kg); LQ, limit of quantification (mg/kg); C, concentration in mg/kg; r^2 determination coefficients ($n = 5$).

^a European Union maximum residue levels (MRLs) taken from (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm).

^b Octanol/water partition coefficients.

^c CI, confidence interval.

recovery for IS was $97.1 \pm 7.5\%$, the intra-day repeatability [RSD (%), $n = 6$ in the same day] was 4.1% and the inter-day repeatability [RSD (%), $n = 17$ in five different days] was 7.7%. These results are in the same range of those reported by Sagratini et al. (2007) for the analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography.

A statistical comparison between the calibration curves constructed using 0, 0.25, 1.0, and 2.5 g of lettuce was performed. Significant differences were observed between calibration curves, indicating a matrix effect on SPME extraction. Additionally, multiple linear regressions with backward stepwise method were constructed using lettuce amounts and pesticide concentrations to predict the pesticide concentration. The regressions obtained for fludioxonil and for iprodione were the only ones without a significant effect from the lettuce amount.

Table 3 presents the linear range tested for each pesticide using 2.5 g of lettuce sample, the respective determination coefficients

(r^2), and the statistical parameters obtained when carrying out the linear regression, the repeatability of peak areas, the LD and LQ. LQ obtained for these compounds were far below the legislated LMR, thus, the sensitivity of the method using 2.5 g of sample is sufficient to enable compliance with food legislation, except for metalaxyl and pirimicarb that were extracted only for concentrations above the respective LMR (Regulation (EC) No. 396/2005).

Studies of the dissipation behaviour of pesticides during the days to harvest require the use of lower amounts of lettuce, owing to the high levels of pesticides, thus, calibration curves using lower lettuce amounts must be constructed for analyses of this type of samples.

3.5. Real sample analysis

The applicability of the method was evaluated by the analysis of lettuce samples from a greenhouse that were sprayed with

pesticides selected by producer according to the results of risk assessment for the main pests and diseases. Samples were taken at 0, 1, 3, 6, 7, 9 and 14 days after pesticide addition to study the dissipation behaviour after pre-harvest interval in accordance with Regulation (EC) No. 396/2005. Two pesticides were quantified folpet and fenhexamid. The rest of the pesticides determined in this work were not present in the analysed samples. Concentration of folpet was 92.8; 53.4; 22.9; 17.9; 7.45; 1.85 mg/kg, respectively for t_0 , t_1 , t_3 , t_6 , t_7 , t_9 and not detected at t_{14} days, the security time of this pesticide is 14 days and the MRL is 2 mg/kg. Concentration of fenhexamid was 158.1; 76.2; 31.0; 27.3; 7.24; 0.87 mg/kg, respectively for t_0 , t_1 , t_3 , t_6 , t_7 , t_9 days, and not detected at t_{14} days, the security time of this pesticide is 7 days and the MRL is 30 mg/kg. The results obtained are in good agreement with information given by grower and with Regulation (EC) No. 396/2005.

4. Conclusions

In this work, it has been selected the most appropriate conditions of SPME coupled to HPLC/DAD detection for the quantification of azoxystrobin, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, and tolyfluanid in lettuce. DAD although less powerful than other detectors has the advantage of being easier to acquire and use, enabling quantification of these pesticides below the maximum residues levels allowed for those compounds in lettuce. The use of SPME as a purification step allows determining them quantitatively without interferences and allows the simplification of the clean-up steps. The factorial designs were used to optimise variables affecting the microextraction process. Confirmatory experiments were conducted with the parameters suggested by the model (X_1 (pH) 8, X_2 (NaCl%) 17.6% and X_3 (extraction time) 30 min) and the response obtained was within 95% predication response interval.

The proposed methodology can be used for screening of pesticides in lettuce samples or to study the dissipation behaviour after pre-harvest interval. Analysis of lettuce samples sprayed with folpet and fenhexamid indicated that after the days to harvest the concentration level (\pm the uncertainty of the result) found for the pesticide residue was below the EU's MRLs, thus causing no problems in terms of food consumption.

Acknowledgements

One of the authors (A. Melo) wishes to thank FCT the grant SFRH/BD/41764/2007. This work has been supported by Project PTDC/AGR-ALI/101583/2008. The authors also acknowledge the Horpozim technician Eng.ª Inês Ramos and the grower Manuel António Silva for the facilities in lettuce harvest.

References

- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- Aulakh, J. S., Malik, A. K., Kaur, V., & Schmitt-Kopplin, P. A. (2005). A review on solid phase micro extraction–high performance liquid chromatography (SPME–HPLC) analysis of pesticides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35, 71–85.
- Beyer, A., & Biziuk, M. (2008). Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108, 669–680.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965–977.
- Covaci, A., Mashiy, J. G., Molope, I., Tshiame, I., Molatlhegi, R., & Ngoben, P. (2010). Miniaturized method based on matrix solid-phase dispersion for the rapid screening of 36 pesticides in agricultural food commodities. *Analytical Letters*, 43, 1400–1410.
- Cunha, S. C., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2007). Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, 30, 620–632.
- Directive 2002/63/EC of 11 July 2002 establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC.
- Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides.
- Falqui-Cao, C., Wang, Z., Urruty, L., Pommier, J. J., & Montury, M. (2001). Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/HPLC/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5092–5097.
- Fernández, M., Picó, Y., & Manes, J. (2002). Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, 65, 1502–1511.
- Ferré, J., Borrull, F., & Marcé, R. M. (1999). Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 844, 425–432.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Silva, E. G. P., Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., et al. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158, 2–14.
- Ferrer, I., Garcia-Reyes, J. F., Mezcu, M., Thurman, E. M., & Fernandez-Alba, A. R. (2005). Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *Journal of Chromatography A*, 1082, 81–90.
- Granby, K., Andersen, J. H., & Christensen, H. B. (2004). Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 520, 165–176.
- Hiemstra, M., & de Kok, A. (2007). Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154, 3–25.
- Hu, Y., Yang, X., Wang, C., Zhao, J., Li, W., & Wang, Z. (2008). A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction–high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 2, 314–319.
- Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y. (2002). Multi-residue analysis of 18 pesticides in fresh fruits, vegetables and rice by supercritical fluid extraction and liquid chromatography–electrospray ionization Mass spectrometry. *Journal of Health Science*, 48, 173–178.
- Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y. (2000). Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC. *Journal of Health Science*, 46, 336–342.
- Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry. A tutorial. *Analytical Chimica Acta*, 652, 161–172.
- Martínez-Galera, M., Lopez-López, T., Gil-García, M. D., & Martínez-Vidal, J. L. (2001). Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 918, 79–85.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (5th ed.). England: Pearson Education Limited.
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments* (5th ed.). New York: Wiley.
- Ortelli, D., Edder, P., & Corvi, C. (2004). Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 520, 33–45.
- Otero, R. R., Grande, B. C., & Gándara, J. S. (2003). Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid–liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 992, 121–131.
- Paíga, P., Morais, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., & Alves, A. (2009). Determination of carbamate and urea pesticide residues in vegetables using microwave-assisted extraction and liquid chromatography. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89, 199–210.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid-phase microextraction: Theory and practice*. New York: Wiley-VCH.
- Perrin, D. D., & Dempsey, B. (1974). *Buffers for pH and metal ion control*. London: Chapman and Hall Ltd.
- Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- Ridway, K., Lalljie, S. P. D., & Smith, R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153, 36–53.
- Rodrigues, M. V. N., Reyes, F. G. R., Rehder, V. L. G., & Rath, S. (2005). An SPMEGC–MS method for determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plant infusions. *Chromatographia*, 61, 291–297.
- Sagrati, G., Manes, J., Giardina, D., Damiani, P., & Pico, Y. (2007). Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147, 135–143.
- Sánchez-Brunete, C., Alberro, B., Martín, G., & Tadeo, J. L. (2005). Determination of pesticide residues by GC–MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. *Analytical Sciences*, 21, 1291–1296.
- Sanchez-Palomo, E., Diaz-Maroto, M. C., & Perez-Coello, M. S. (2005). Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC–MS. *Talanta*, 66, 1152–1157.

- SANCO/10684/2009 (01/01/2010), 2009.
- Sandra, P., Tienpont, B., & David, F. (2003). Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000, 299–309.
- Sannino, A., Bolzoni, L., & Bandini, M. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1036, 161–169.
- Soler, C., Manes, J., & Picó, Y. (2004). Liquid chromatography-electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A*, 1048, 41–49.
- Stajnbaher, D., & Zupancic-Kralj, L. (2003). Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015, 185–198.
- Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., & González, L. (2004). Analysis of pesticide residues in juice and beverages. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 34, 165–175.
- Vandeman, A., Shank, D., Chandran, R., & Vasavada, U. (1992). Lettuce provides indication of pesticide use and residues. *Food Reviews*, 15, 2–5.
- Wang, Z., Hennion, B., Urruty, L., & Montury, M. (2000). Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: A complementary technique to solid-phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries. *Food Additives and Contaminants*, 17, 915–923.

Capítulo 4

Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography

Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography

Armindo Melo^a, Catarina Mansilha^{b,c}, Olívia Pinho^{a,d}, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira^{a,*}

^a REQUIMTE/ Departamento de Química, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313- Porto, Portugal.

^b Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Rua Alexandre Herculano n.º 321, 4000-055 Porto, Portugal.

^c REQUIMTE/Universidade do Porto, Portugal.

^d Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

* Corresponding author: email: isabel.ferreira@ff.up.pt; Telef: +351220428642; Fax: +351226093390

Abstract

A new sample preparation procedure combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was optimized for the determination at trace levels of thirteen pesticides from different chemical families (i.e. 2,4-D, acetamiprid, bentazone, cymoxanil, deltamethrin, dicamba, diuron, foramsulfuron, mesotrione, metalaxyl-M, methomyl, pyraclostrobin and tembotrione) in tomato by HPLC with diode array detection (DAD). Target pesticides from tomato samples were isolated by liquid partitioning with acetonitrile and salts and cleanup by d-SPE, the analytes were concentrated in chloroform by the DLLME procedure. The disperser solvent from DLLME was used at the same time as carrier of analytes from extraction in QuEChERS method. The main factors affecting sample cleanup by d-SPE in QuEChERS and DLLME yield were optimized by means of an experimental design. Under the optimum conditions, good linearity was obtained, the recoveries of pesticides in tomato samples at spiking levels between 0.01 and 1.00 mg/kg ranged from 85.7-115.6 % (for methomyl and cymoxanil, respectively). Precision was within 15.0% (RSD) except at the LQ for tembotrione, which was 17.4%. Limits of quantification achieved (ranging from 0.0093 to 0.149 mg/kg) were below the maximum residue limits established by the European Union (EU).

Keywords: Pesticides, tomato, QuEChERS, DLLME, HPLC-DAD, experimental design

Introduction

The presence of pesticide residues in horticultural products is of concern to human health. European Union and *Codex Alimentarius* established maximum residues levels (MRLs) to regulate pesticides levels in fruits and vegetables, to ensure consumer safety and regulation of foreign trade (European Commission 2005). Tomato is a typical representative commodity of the category fruiting vegetables (with high water content) (Directorate General Health and Consumer Protection 2009). Consequently, search for pesticide residue in this type of vegetable is of major concern.

Development of analytical methods for analyses of pesticides in fruiting vegetables, such as tomato, is difficult due to the fact that compounds of different polarities, solubility's, volatilities and pKa values have to be simultaneously extracted and analysed (Štajnbaher and Zupančič-Kralj 2003; Ravelo-Pérez et al. 2009). The analytes present diverse properties and polar pesticides are particularly challenging to analyse (e.g. methomyl, acetamiprid, dicamba, cymoxanil, foransufulron, mesotrione, bentazone, 2,4-D). Additionally, the matrix presents a very complex composition and potential interferences can be co-extracted.

QuEChERS sample preparation method stands for “quick, easy, cheap, effective, rugged and safe”. The novelty of this extraction procedure, introduced by Anastassiades et al. 2003 for the multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables was the use of MgSO_4 for salting out extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction (d-SPE) for cleanup. This became an AOAC International Official Method 2007.01 and CEN standard method EN 15662, with few modifications (Lehotay et al. 2010). Among other beneficial features, the QuEChERS procedure uses acetonitrile (MeCN), which enables extraction of wide polarity range analytes. Different sorbents and amounts can be used in

d-SPE, namely: weak ion exchange such as primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) and C18. Other advantages of QuEChERS methodology are its flexibility, high degree of selectivity and sensitivity (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2010; Lehotay et al. 2005; Kmellár et al. 2010). However, the major disadvantage is its low enrichment factors (Cunha and Fernandes 2011).

During the last year's, miniaturized extraction procedures have been introduced with success, namely dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) (Rezaee et al. 2006). The DLLME method is based on the dispersion of an extraction solvent (immiscible in water) combined with a disperser solvent (miscible in both water and extraction solvents) within an aqueous solution. The ternary component solvent system forms a cloudy suspension, which establishes a very high contact area between the aqueous phase and the extraction solvent (Herrera-Herrera et al. 2010; Rezaee et al. 2010; Dadfarnia and Shabani 2010; Caldas et al. 2010).

The DLLME method presents important advantages such as simplicity of operation, quickness, low cost, easier manipulation, fewer amounts of organic extraction solvents, high recovery and enrichment factor and easier linkage to analytical methods (Caldas et al. 2010; Sarafray-Yazdi and Amiri 2010). Its application has been extended to separation, preconcentration and determination of organic and inorganic compounds in liquid samples, but most studies of pesticides evaluated the extraction of few compounds (Fu et al. 2009) or pesticides that belong to the same chemical group, with the same behaviour (Caldas et al. 2010).

Nevertheless the complexity of food samples is a drawback that difficult its application in food analysis. DLMME technique in food analysis requires a previous extraction or cleaning step, especially for solid or semisolid samples (Asensio-Ramos et al. 2011). Combination of QuEChERS with DLLME can be of interest due to the simplicity of

operation and low costs associated with high recoveries and easier linkage to analytical methods such as GC or LC. The use of powerful mass spectrometric detectors has played a vital role to solve many problems related to food safety (Malik et al. 2010, Sharma et al. 2010). However, these types of detectors are very expensive and not available for all laboratories. Diode Array Detection (DAD), although, presents lower selectivity, sensitivity and specificity, the relatively low cost for equipment setup makes it an attractive detection method (Chou et al. 2009). Thus, validations of low cost methods that enable analyses of trace levels of pesticides in complex matrices using HPLC/DAD are relevant. The aim of this work is the development of a quick and inexpensive sample preparation combining QuEChERS and DLLME methods for the determination of trace levels of thirteen pesticides in tomato using HPLC/DAD. These pesticides (i.e. 2,4-D, acetamiprid, bentazone, cymoxanil, deltamethrin, dicamba, diuron, foramsulfuron, mesotrione, metalaxyl-M, methomyl, pyraclostrobin and tembotrione) belong to different chemical families. Special attention was given to optimization of sample cleanup by d-SPE in QuEChERS procedure and to the nature and amount of extraction solvent, sample pH and salting out effect in DLLME methodology. Experimental design methodology (a full factorial central composite design) was used for the optimization of some experimental parameters, as, PSA and GCB amounts, extraction solvent volume and NaCl percentage, whereas the other parameters were previously optimized by univariate analysis.

Experimental

Chemicals and reagents

All pesticides had analytical-grade (purity >97.8%) including 2,4-D, acetamiprid, bentazone, cymoxanil, deltamethrin, dicamba, diuron, foramsulfuron, mesotrione, metalaxyl-M, methomyl, pyraclostrobin and tembotrione were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The 4-nitrophenyl acetate (NPA) and 2-Nitrophenyl phenyl ether (NDPE) with purity >99% from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) were used as internal standard (IS). All the solvents used, including acetonitrile (MeCN), were HPLC-grade from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water (0.054 μ S/cm) was obtained by using a Milli-Q system from Millipore (Milford, MA, USA).

Standard solutions of each pesticide were prepared in acetonitrile and kept with light excluded in a freezer. Working mixtures of appropriate concentrations were prepared weekly and kept at low temperature in the dark (according SANCO guidelines (Directorate General Health and Consumer Protection 2009)).

Buffer solutions with pH 1, 3, 5 and 8 were prepared to study the effect of pH on DLLME pesticide extraction (Perrin and Dempsey 1974). Buffer with pH 1, selected for analysis of real samples, contained 25 mL 0.2M KCl, 67 mL of 0.2M HCl, diluted with ultrapure water to 100 mL (Perrin and Dempsey 1974).

Dispersive-SPE sorbents used included C18-bonded silica (particle size 55–105 μ m) from Waters (Milford, MA, USA), primary secondary amine (PSA; particle size 50 μ m) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and graphitized carbon black (GCB, 100-400 of mesh) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous magnesium sulphate (anhydrous MgSO₄) and sodium chloride (NaCl) were analytical grade from Riedel-de Haën (Buchs,

Switzerland). To ensure efficient removal of phthalates and residual water, MgSO₄ was treated for 5 h at 500 °C in a muffle furnace.

Extraction solvents chloroform, chlorobenzene, trichloroethylene, tetrachloromethane, tetrachloroethylene were high purity solvents for HPLC analysis obtained from Fluka.

HPLC-DAD conditions

The chromatographic analysis was carried out in an analytical Jasco HPLC unit (Tokyo, Japan) equipped with PU-1580 HPLC pumps, a Column Heater (Model 7981; Jones Chromatography, Hengoed, UK), with Rheodyne valve 7725i (Supelco, USA) and MD-910 Plus multiwavelength detector. The separation was achieved in a reversed-phase column Ultracarb ODS (30) C18 (5 µm, 250 mm 4.6 mm) (Phenomenex, Milford, MA, USA). The Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France) was also used. The HPLC was carried out by gradient elution with a mixture of two solvents and a flow of 1 mLmin⁻¹. Solvent A consisted of 10 mM formic acid/sodium formate buffer solution at pH 3, solvent B consisted of acetonitrile. The linear gradient program was 0 - 5 min, 25% B in A, 5 - 22 min, 25 - 50% of B in A; 22 - 30 min, 50 - 97 % of B in A, 30 - 38 min, 97% B in A; 38 - 50 min, column rinse and re-equilibration. Separations were carried out at 35 °C of temperature. Diode Array detection was set at maximum absorbance, except for acetamiprid at 250 nm and deltamethrin and pyraclostrobin at 285 nm. Peak identification in samples was carried out by comparing retention times and spectra of unknown peaks with reference standards, as well peak purity.

Combined QuEChERS and DLLME sample preparation procedure

Certified organic tomato samples were bought in a local supermarket from Porto.

In the first step, representative portions of unwashed pesticide free fresh tomato sample were chopped using a kitchen hand blender set Silvercrest SSMS 600 B2 Kompernass (Bochum, Germany).

The optimized and validated sample preparation procedure entailed the following steps: (i) weigh 10 ± 0.1 g of thoroughly comminuted tomato sample into a 50 mL centrifuge tube; (ii) add the spiking standard and IS solution and vortex for 1 min to let the pesticides better integrate into samples; (iii) dispense 10 mL MeCN to the samples, seal the tubes and shake the tubes vigorously by hand for 30 s; (iv) transfer to the sample tubes 4 g anhydrous MgSO_4 and 1 g NaCl; (v) cap the tubes and shake them vigorously by hand for 1 min (avoiding formation of oversized MgSO_4 agglomerates); (vi) centrifuge the tubes at 5000 rpm for 5 min; (vii) pick up ca. 8 mL of MeCN extract (upper layer) to 15 mL amber vial; (viii) transfer 3 mL of extract to the d-SPE tubes containing 100 mg PSA, 50 mg C18, and 5,26 mg GCB; (ix) seal the d-SPE tubes, vortex for 30 s and centrifuge at 3000 rpm for 3 min; (x) transfer 2 mL of the final extracts into the Sarstedt 15mL conical tubes; (xi) add 400 μL of chloroform; (xii) add 10 mL of buffer pH = 1 with 400 mg NaCl; (xiii) cloudy solution resulted from dispersion of fine droplets of chloroform in aqueous solution was formed in the test tube by shaking the tubes vigorously by hand for 1 min; (xiv) centrifuge conical tubes at 5000 rpm for 4 min and the upper aqueous phase was removed with a pipette (dispersive particles were sediment at the bottom of the centrifuge tube); (xv) After this process, the organic phase was evaporated in a gently stream of nitrogen and reconstituted in 50 μL of MeCN and 20 μL was injected into the HPLC system for analysis.

Experimental design

The nature of extraction solvent and sample pH in DLLME method were optimized by univariate analyses, whereas experimental design methodology (a full factorial central composite design) was used for the optimization of PSA and GCB amounts, extraction solvent volume and NaCl percentage.

Optimization of conditions for pesticide extraction from tomato was carried out using Response Surface Methodology (RSM). Experiments with four independent variables, PSA amount (X1), GCB amount (X2), extraction solvent volume (X3), and NaCl percentage (X4) were conducted following the experimental design statistical analysis obtained by the full factorial central composite design (CCD). In this work, the full CCD consisted of (i) a complete 2^4 factorial design, (ii) n_0 , center point ($n_0 > 1$), and (iii) two axial points on the axis of each design variable at a distance of $R=2.000$ from the design center. Hence, a total number of design points of $N=2^k+2k+n_0$ was used. The complete design consisted of 30 combinations including 6 replicates of the center point with 5 degrees of freedom for calculation of errors in the experiments. The optimal values of response Y (individual peak area of interest compounds) were obtained by solving the regression equation and by analysing the response surface contour plots.

The minimum and maximum values for PSA amount (X1), GCB amount (X2), extraction solvent volume (X3), and NaCl percentage (X4) are listed in Table 1. The levels of coded independent variables with the respective α rotation are also inserted. The resulting 30 experiments were carried out randomly.

The goodness-of-fit of the regression model and the significance of parameter estimates were determined through appropriate statistical methods. Design-Expert trial-version 8.0.6. was used (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

Results and discussion

Optimized HPLC-DAD chromatographic conditions

Thirteen pesticides (2,4-D, acetamiprid, bentazone, cymoxanil, deltamethrin, dicamba, diuron, foramsulfuron, mesotrione, metalaxyl-M, methomyl, pyraclostrobin and tembotrione) were analysed in this study. These compounds have very diverse properties and can be analysed by liquid chromatography (Table 2).

Optimization of HPLC-DAD conditions was first focused on chromatographic separation of the thirteen pesticides under study. A mobile phase contained formic acid and sodium formate buffer (10 mM, pH = 3) as aqueous phase and acetonitrile as organic phase, was selected to enable appropriate chromatography behaviour of acidic pesticides. Increasing concentration of organic phase from 25% up to 97% enabled to obtain separation of different pesticides.

The different steps involved in the extraction of pesticides from the matrix require the use of IS, two compounds were selected, the 4-nitrophenyl acetate (NPA) and 2-nitrophenyl ether (NDPE). These compounds are not present in tomato matrix, have appropriate chromatographic elution with well resolved peaks and a UV-vis spectrum different from that of pesticides and interferences.

The DAD spectra of each pesticide, IS and interferences were analysed and created a library with these spectra. The quantification of compounds was made at the maximal absorbance, except for acetamiprid (250 nm was preferred) and deltamethrin and pyraclostrobin (285 nm was the most appropriate for these pesticides). Fig. 1 presents optimum separation of the selected group of pesticides added to a tomato sample analysed

by HPLC-DAD at their maximum UV absorbance wavelengths and a tomato sample without addition of pesticides. As shown in the Fig. 1 QuEChERS and DLLME extractions from certified organic tomato samples revealed the absence of the selected pesticides and some interfering compounds were also present, however, they do not influence the detection and quantification of the selected pesticides.

Figure 1

QuEChERS and DLLME parameters selection

Unbuffered QuEChERS method (modified from literature for sample preparation of vegetables Anastassiades et al. 2003) was used as first step extraction procedure of pesticide compounds from matrix. The procedure involves initial single-phase extraction of 10 g sample with 10 mL acetonitrile, followed by liquid–liquid partitioning formed by addition of 4 g anhydrous MgSO₄ plus 1 g NaCl, the extract was recovered (± 8 mL). Major advantage of QuEChERS methodology is its high degree of selectivity and sensitivity (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2010; Lehotay et al. 2005). However, the low enrichment factors observed are its main disadvantage (Cunha and Fernandes 2011). Thus, DLLME procedure was tested, using several extraction solvents, such as, chloroform, chlorobenzene, carbon tetrachloride, trichloroethane, tetrachloroethylene. Different buffers (pH 1, 3, 5 and 8) were tried as aqueous phase.

Preliminary experiments were carried out with the aim of selecting the best extracting solvent and the pH of aqueous phase. For selection of the best extraction solvent the

experiments were performed using 5 mL of ultra-pure water with 1 mL of MeCN extract of QuEChERS (after d-SPE with 100 mg of C18 and 175 mg of PSA). A cloudy solution resulted from dispersion of fine droplets of a volume of 100 μ L of extraction solvent (chloroform, chlorobenzene, trichloroethylene, tetrachloromethane, tetrachloroethylene) when injected into the 5 mL water placed in the test tube. Fig. 2 shows the effect of different extraction solvents on total chromatographic peak area of the different pesticides. As can be seen from Fig. 2, chloroform gave the highest peak area for all pesticides under study, except for cymoxanil, dicamba, pyraclostrobin and deltamethrin. Therefore chloroform was selected as the extraction solvent.

Figure 2

The pH influences the ionization form of certain compounds, and consequently, their water solubility and extractability. The effect of the pH upon pesticides extractability with DLLME was investigated at pH 1, 3, 5 and 8 (Perrin and Dempsey 1974), using 5 mL of buffer solution, with 1 mL of MeCN QuEChERS extract and 100 μ L of chloroform as extraction solvent (Fig. 3). The pH values close to 1 enhance the analytical signal of dicamba, foramsulfuron, mesotrione, bentazone and 2,4-D, whereas the signal of other pesticides was not significantly affected by pH variation ($p > 0.05$). At pH 1 acidic pesticides present a neutral form and a higher tendency to partition into the organic solvent if compared with ionized form.

Figure 3

After selection of extraction solvent and aqueous phase pH, the next step was to study the range of variation for these parameters and the volume of QuEChERS extract to guarantee that cloudy suspension was formed as well as a sedimented phase was clearly obtained in the bottom of the tube. For this purpose, 10 mL of buffer solution and 2 mL of QuEChERS are required, whereas, the volume of extraction solvent was further optimized.

Combined QuEChERS and DLLME sample preparation procedure requires slight modification of the QuEChERS protocol usually used for fruits and vegetables in order to increase the detection limits. The cleanup has to be made taking in account the further DLLME extraction. Thus, 3 mL of QuEChERS extract were used in d-SPE (instead of 1 mL of MeCN extract usually used (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2010; Lehotay et al. 2005; Cunha and Fernandes 2011)) in order to recover 2 mL of cleaned extract to be used in DLLME method.

Co-extracted matrix components: Chromatographic Interferences

Chlorogenic acid and rutin are polar compounds and elute before 20 min under the chromatographic conditions used. Carotenoids (mainly lycopene) elute in the chromatogram after 20 min and exhibit a peculiar visible spectrum characterized by the presence of three maxima between 400 and 500 nm. These compounds present in tomato matrix are chromatographic interferences in the proposed extraction procedure.

Dispersive-SPE permits the use of different combinations of sorbents in appropriate amounts to act as a “chemical filter” and remove matrix interferences without retain the analytes. The use of C18 sorbent retains trace amounts of lipid matrix components and is commonly used to remove apolar interferences, in combination with PSA (Lehotay et al. 2005). HPLC/DAD analyses of tomato extracts using cleanup with PSA indicated that this sorbent removed and/or decreased chromatographic peaks of some less polar interfering compounds (Lehotay et al. 2010). This type of sorbent has high capacity of removing fatty acids, flavonoids, organic acids, sugars and pigments (Lehotay et al. 2010). GCB has a strong affinity towards planar molecules and removes pigments, such as, chlorophylls and carotenoids (Anastassiades et al. 2003). The combination of PSA and GCB gave improved cleanup of matrix components from tomato, but their amounts must be carefully selected to prevent that analytes are also removed. The use of a mixture of three d-SPE dispersive sorbents (C18, PSA and GCB) was needed to minimize the presence of co-extracted matrix components (results not shown).

Experimental design

Taking in account the results obtained in preliminary studies described above, a full factorial central composite design was built with 30 experimental points (2^4 full factorial design, with eight axial points with $\alpha = 2$ and 6 replicates for center point) for appropriate optimization of most important factors affecting QuEChERS cleanup (i.e. amount of PSA and GCB) and DLLME extraction yield (i.e. chloroform amount, NaCl percentage).

The individual peak areas of all analytes were introduced separately as the response in the statistical program. Each model structure was evaluated by means of analysis of variance (ANOVA) namely by ensuring statistical significance of regression coefficients, regression and evaluating the lack-of-fit (Khodadoust and Hadjmohammadi 2011). The obtained results from individual analysis of each compound were studied. In general, higher amount of extraction solvent lead to a higher analytical signal in almost all analytes. The NaCl percentage also gives an increase of signal, but in this case only was for the first compounds eluted, namely, methomyl, acetamiprid, dicamba, cymoxanil, 2,4-D. The amount of PSA and GCB, reduces the peak area of interfering compounds but also reduces the chromatographic peak area of the analytes that are significant variables in the statistical program.

The simultaneous extraction of pesticides with very different properties from a complex matrix such as tomato requires a compromise between each individual extraction optimum condition. For that purpose the optimization tool of the statistical program was used, that explores the response surface and gave a point prediction as a result of defined goals. To achieve this goal the analytical signal of one pesticide that has the lowest MRL (foramsulfuron), the two internal standards (NAP and NDPE) and one usual interfering peak that appear in tomato samples were selected. The goals for each response were set;

maximize the NAP, NDPE and foramsulfuron and minimize the interfering compound to construct desirability indices. The program combines the individual desirabilities into a single number and then searches for the greatest overall desirability. A value of one represents the ideal case. A zero indicates that one or more responses fall outside desirable limits. Graphical analysis of desirability is presented in Fig. 4. The following optimum experimental conditions were obtained: 100 mg PSA, 5.26 mg GCB, 4% NaCl and 400 μ L of chloroform. These optimum conditions were tested (6 runs) and the predicted response value of each studied compound was in agreement with experimental results (Table 3).

Figure 4

Analytical performance

Verification of analytical performance of the purposed method was performed by matrix matched calibration, recovery and accuracy studies. The linearity was investigated over the ranges indicated in Table 4 for each pesticide. For this purpose the certified organic tomato samples were spiked with the different amounts of pesticide standards and the same amount of the two internal standards before acetonitrile addition.

Calibration curves were calculated from the quotient between analytes area to internal standard versus the concentration of each compound. Analysis of the surface response curves of the experimental design indicate that NPA, 2,4-D, acetamiprid, bentazone, cymoxanil, dicamba, diuron, foramsulfuron, mesotrione, metalaxyl-M, methomyl were more influenced by NaCl percentage, volume of chloroform and PSA amount, thus NPA

has been used as internal standard for these pesticides. Whereas, for NDPE and deltamethrin, pyraclostrobin and tembotrione the GCB amount was the major as factor that conditioned the analytical signal. Thus, NDPE was used as internal standard for these three pesticides.

Calibration curves have been obtained using a weighted least squares linear regression model and the concentration range between levels is presented in Table 4, using seven matrix-calibration standards of each analyte. The calibration parameters, related standard deviations and uncertainties were calculated according to Miller and Miller and Mansilha et al. (Miller and Miller 2005, Mansilha et al. 2010). The weighting factors applied were calculated using the inverse of the variances (s_i^{-2}), and the sums of relative errors (% RE) were used as quality indicators of adjustment in the assessment of weighted linear regression. Correlation coefficients (r^2) higher than 0.9980 were obtained. Each test was performed in at least five independent experiments. The quantification limits (LQs) and detection limits (LDs) were calculated based on the standard deviations of the weighted intercept and calibration curve parameters.

It should be noted that the purposed analytical method, combining QuEChERS / DLLME and HPLC/UV allowed the quantitation of pesticides at trace levels, for all pesticides under study the LQs were lower than the MRLs established in the EU regulation (Table 4).

A statistical comparison was performed between the calibration equations obtained from standards dissolved in acetonitrile and in spiked sample extracts (matrix matched calibration) in order to evaluate the matrix effect. Comparison of the slopes of the calibration curves were statistical evaluated by F and p-values according to (Zar 2010). For all pesticides statistical differences were observed (p-values for the comparison of the slopes were ≤ 0.001) and as a result, according to EU Guidelines (SANCO) (Directorate

General Health and Consumer Protection 2009), quantification should be developed using the calibration curves obtained with the tomato sample.

Recovery studies at two concentration levels were performed to evaluate the accuracy and repeatability of the whole method ($n = 3$ for intra-day assays and $n = 9$ for interday assays). The lower spiking level was near the MRLs of each pesticide for tomato. Mean recoveries ranged between 85.7-115.6 % (for methomyl and cymoxanil, respectively). With respect to intraday RSD it was lower than 3.5 % for retention time and lower than 14.2 % for area. Interday RSD was lower than 5.4 % for retention time and lower than 17.4 % for area. The results obtained highlight that the optimized method achieves acceptable recoveries according to EU Guidelines (SANCO) (Directorate General Health and Consumer Protection 2009). It is required that precision be within 15% (RSD) except at the LQ, which can assume a value $\pm 20\%$.

Conclusions

The combination of QuEChERS with DLLME is a simple, quick and inexpensive way to obtain low detection limits for thirteen pesticides from different chemical classes analysed in tomato samples. After isolation of the target pesticides from samples with liquid partitioning with acetonitrile and salts and cleanup by d-SPE, the analytes were concentrated in chloroform by the DLLME procedure. The disperser solvent from DLLME was used at the same time as carrier of analytes from extraction in QuEChERS method. The novel sample preparation procedure combined with HPLC-DAD method provided appropriate accuracy and repeatability. The quantification limits achieved were below the maximum residue levels established in EU regulation.

Acknowledgments

One of the authors (A. Melo) wishes to thank Fundação Ciência Tecnologia the grant SFRH/BD/41764/2007. This work has been supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia through Project PTDC/AGR-ALI/101583/2008 and PEst-C/EQB/LA0006/2011.

References

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* 86(2):412-431.
- Asensio-Ramos M, Ravelo-Pérez LM, González-Curbelo MÁ, Hernández-Borges J. 2011. Liquid phase microextraction applications in food analysis. *J Chromatogr A.* 1218(42):7415-7437.
- Caldas SS, Costa FP, Primel EG. 2010. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta.* 665(1):55-62.
- Chou TY, Lin SL, Fuh MR. 2009. Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta* 80(2):493–498.
- Cunha SC, Fernandes JO. 2011. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1218(43):7748-7757.

Dadfarnia S, Shabani AMH. 2010. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals--a review *Anal Chim Acta*. 658(2):107-119.

Directorate General Health and Consumer Protection. 2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/10684/2009, 1 January 2010. Brussels (Belgium): Directorate General Health and Consumer Protection, European Commission.

European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off J Eur Comm*. L70:1–16.

Fu L, Liu X, Hu J, Zhao X, Wang H, Wang X. 2009. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Anal Chim Acta*. 632(2):289-295.

Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA. 2010. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trend Anal Chem*. 297:728-751.

Khodadoust S, Hadjmohammadi M. 2011. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. *Anal Chim Acta*. 699(1):113-119.

Kmellár B, Abrankó L, Fodor P, Lehotay SJ. 2010. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27(10):1415-30.

- Lehotay SJ, Maštovska K, Yun SJ. 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J AOAC Int.* 88(2):630-638.
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Maštovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables *J Chromatogr A.* 1217(16):2548-2560.
- Malik AK, Blasco C, Picó Y. 2010. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A.* 1217(25):4018-4040.
- Mansilha C, Melo A, Rebelo H, Ferreira IM, Pinho O, Domingues V, Pinho C, Gameiro P. 2010. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *J Chromatogr A.* 1217(43):6681-6691.
- Miller JN, Miller JC. 2005. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry.* 5th ed. England: Pearson Education Limited.
- Perrin DD, Dempsey B. 1974. *Buffers for pH and metal ion control.* London: Chapman and Hall Ltd.
- Ravelo-Pérez LM, Hernández-Borges J, Asensio-Ramos M, Rodríguez-Delgado MA. 2009. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J Chromatogr A.* 1216(43):7336-7345.
- Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A.* 1116(1-2):1-9.
- Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. 2010. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J Chromatogr A.* 1217(16):2342-57.

Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. 2010. Liquid-phase microextraction *Trend Anal Chem.* 29(1):1-14.

Sharma D, Nagpal A, Pakade YB, Katnoria JK. 2010. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: a review. *Talanta.* 82(4):1077–1089.

Štajnbaher D, Zupančič-Kralj L. 2003. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1015(1-2):185-198.

Zar JH. 2010. *Biostatistical analysis.* 5th ed. New Jersey: Pearson Education.

Table 1 – Independent variables and their coded values used for optimization

Independent variable	Unit	Symbol	Coded levels				
			-2	-1	0	1	+2
PSA amount	mg	X ₁	25	100	175	250	325
GCB amount	mg	X ₂	0	3	6	9	12
Extraction solvent volume	μL	X ₃	25	150	275	400	525
NaCl percentage	%	X ₄	0	4	8	12	16

Table 2 - List of chemical characteristics of the pesticides under study: chemical group, molecular mass (MM), log of octanol-water coefficient ($\log K_{ow}$ - at pH=7 and 20 °C) and acid dissociation constant (pK_a) at 25 °C

Pesticides	Chemical group	MM	$\log K_{ow}$	pK_a (25 °C)
2,4-D	Alkylchlorophenoxy	221.0	2.58	2.87
Acetamiprid	Neonicotinoid	222.7	0.80	0.70
Bentazone	Benzothiazinone	240.3	0.77	3.30
Cymoxanil	Cyanoacetamide-oxime	198.2	0.67	9.30
Deltamethrin	Pyrethroid	505.2	4.60	N/A
Diuron	Phenylurea	233.1	2.87	N/A
Dicamba	Benzoic acid	221.0	-1.88	1.97
Foramsulfuron	Sulfonylurea	452.4	-0.78	4.60
Mesotrione	Triketone	339.3	0.11	3.12
Metalaxyl-M	Phenylamide	279.3	1.71	N/A
Methomyl	Carbamate	162.2	1.24	N/A
Pyraclostrobin	Strobilurin	387.8	3.99	N/A
Tembotrione	Triketone	440.8	-1.09	3.18

N/A- Not applicable

Table 3 - Predicted response value of each studied compound and experimental results using 100 mg PSA, 5.26 mg GCB, 4% NaCl and 400 μ L of chloroform.

	Foransulfuron	NAP	NDPE	Interfering Peak
Predicted Value	262788.1	306338.9	162866.8	323497.5
Experimental	285185.3	315920.7	150049.9	308681.6
Str. Dev. Experimental	68807.2	49240.8	13117.6	82984.8

Table 4 - Calibration parameters, related standard deviations and uncertainties were calculated according (Miller and Miller, 2005). The standards were prepared under the same conditions applicable to the samples. Each test was performed in at least five independent experiments.

	LR(mgkg ⁻¹)	$b_w \pm t_{(n-2)} S(b)_w$	$a_w \pm t_{(n-2)} S(b)_w$	r^2_w	LD(mgkg ⁻¹)	LQ(mgkg ⁻¹)	MRL (mgkg ⁻¹)	$S(y/x)_w$
2,4-D	0.050-0.750	0.6116 ± 0.0027	0.0166 ± 0.0012	0.9996	0.0141	0.0470	0.05	0.0029
Acetamiprid	0.010-0.150	9.6452 ± 0.1321	0.0737 ± 0.0119	0.9991	0.0052	0.0174	0.10	0.0168
Bentazone	0.010-0.150	3.9430 ± 0.0616	0.0373 ± 0.0056	0.9991	0.0059	0.0198	0.10	0.0078
Cymoxanil	0.010-0.150	3.8923 ± 0.0358	-0.0221 ± 0.0032	0.9997	0.0035	0.0117	0.20	0.0045
Deltamethrin	0.125-0.750	0.4300 ± 0.0026	0.0573 ± 0.0013	0.9990	0.0176	0.0586	0.30	0.0025
Diuron	0.010-0.150	1.7782 ± 0.0273	0.0945 ± 0.0025	0.9980	0.0058	0.0194	0.10	0.0035
Dicamba	0.250-1.500	1.3284 ± 0.0063	-0.2748 ± 0.0061	0.9994	0.0148	0.0495	0.05	0.0066
Foramsulfuron	0.010-0.150	3.9311 ± 0.0013	-0.0092 ± 0.0001	0.9999	0.0017	0.0058	0.01	0.0023
Mesotrione	0.010-0.150	5.3388 ± 0.0795	0.0458 ± 0.0072	0.9992	0.0057	0.0189	0.05	0.0101
Metaxyl-MI	0.250-1.500	0.1582 ± 0.0023	0.0183 ± 0.0022	0.9994	0.0448	0.1494	0.20	0.0024
Methomyl	0.010-0.150	5.1893 ± 0.0284	0.0229 ± 0.0026	0.9999	0.0021	0.0070	0.02	0.0036
Pyraclostrobin	0.010-0.150	2.1233 ± 0.0156	0.0954 ± 0.0014	0.9994	0.0028	0.0093	0.20	0.0020
Tembotrione	0.010-0.150	3.1432 ± 0.0337	-0.0002 ± 0.0030	0.9987	0.0041	0.0136	0.02	0.0043

LR - linear range, b_w - weighted slope, a_w - weighted intercept, r^2_w - weighted correlation coefficient, $S(b)_w$ and $S(a)_w$ - standard deviations of the weighted slope and weighted intercept, $S(y/x)_w$ - standard deviation of y-residuals of weighted regression line, LD - limit of detection, LQ - limit of quantification. MRL - maximum residue level from Regulation (EC) No 396/2005

Table 5 – Results of the analysis carried out to evaluate the accuracy and repeatability of the proposed QuEChERS and DLLME method combined with HPLC-DAD for the selected pesticides in tomato samples (n = 3 for intraday assays and n = 9 for interday assays)

	Spiked level (mg kg ⁻¹)	RSD % Intraday		RSD % Interday		Recovery %	Matrix Effect
		RT	Area	RT	Area		
2,4-D	0.05	0.2	8.5	0.3	9.3	96.8	Yes
	0.50	1.6	1.0	2.6	7.8	93.0	
Acetamiprid	0.01	0.1	4.2	0.5	14.3	90.8	Yes
	0.10	3.5	7.9	5.4	9.3	109.9	
Bentazone	0.01	0.6	14.2	0.5	14.0	93.3	Yes
	0.10	2.3	1.3	2.9	5.8	99.2	
Cymoxanil	0.01	1.9	9.3	3.7	13.5	115.6	Yes
	0.10	2.4	3.0	3.9	10.4	104.1	
Deltamethrin	0.125	0.2	12.5	0.4	9.3	83.3	Yes
	0.50	0.2	1.5	0.5	13.7	108.9	
Diuron	0.01	0.4	2.1	0.3	8.4	102.0	Yes
	0.10	1.4	4.7	2.2	8.8	100.9	
Dicamba	0.25	1.8	13.2	1.2	14.7	100.3	Yes
	1.00	3.0	2.4	4.6	14.2	97.4	
Foramsulfuron	0.01	0.3	8.5	0.3	12.3	114.4	Yes
	0.10	2.3	3.0	3.7	5.8	86.3	
Mesotrione	0.01	0.2	3.4	0.1	9.2	88.9	Yes
	0.10	2.2	4.4	3.1	7.4	98.5	
Metalaxyl-M	0.25	0.2	8.4	0.2	14.7	98.6	Yes
	1.00	1.4	6.4	2.3	12.3	102.0	
Methomyl	0.01	2.1	3.9	1.8	6.5	109.7	Yes
	0.10	2.3	5.3	3.6	12.1	85.7	
Pyraclostrobin	0.01	0.2	8.4	0.2	12.7	95.1	Yes
	0.10	0.4	6.6	0.5	11.2	102.2	
Tembotrione	0.01	0.0	11.7	0.2	17.4	100.0	Yes
	0.10	0.5	0.3	0.9	7.6	107.2	

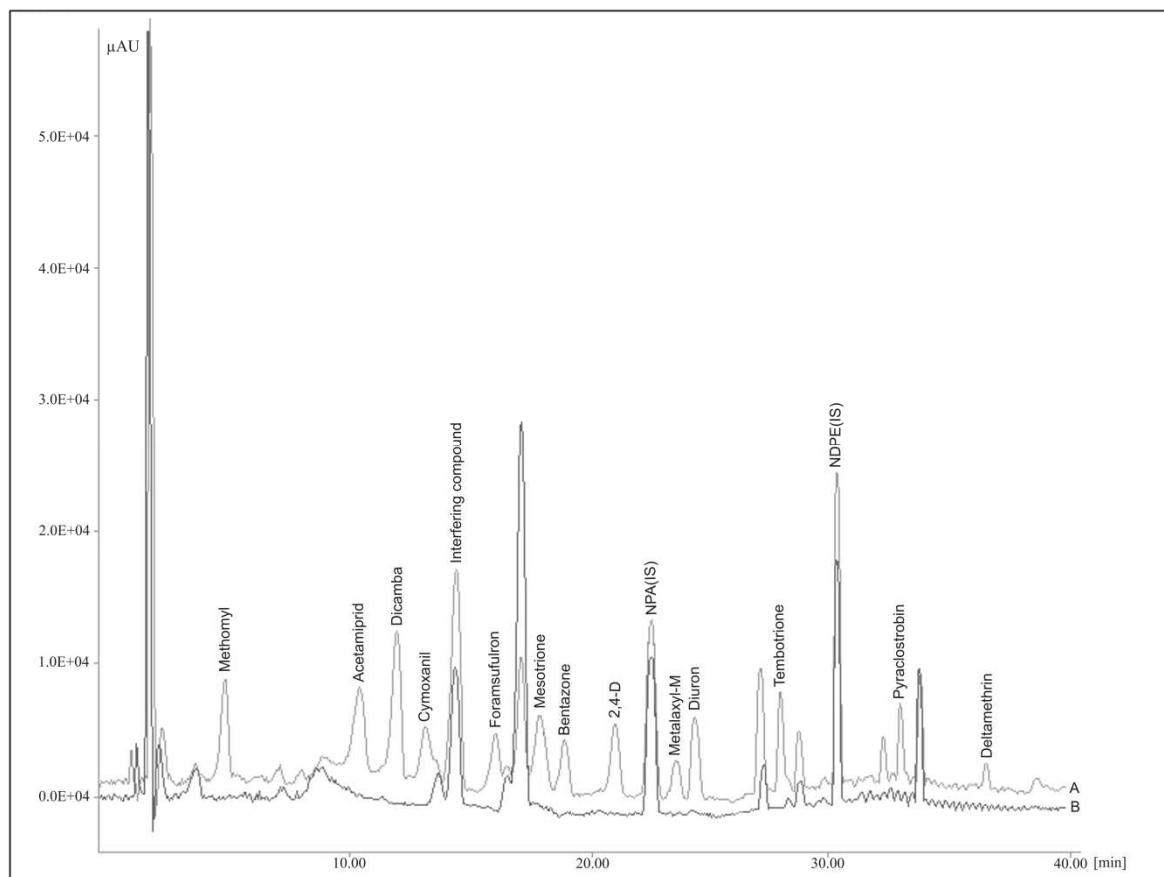


Fig. 1 – (A) Chromatographic separation of the selected group of pesticides added (concentration 1.0 mgkg^{-1} for dicamba and metalaxyl-M; 0.5 mgkg^{-1} for 2,4 – D and deltamethrin, 0.1 mgkg^{-1} for the other nine pesticides) to a sample of organic tomato analysed by HPLC-DAD at their maximum UV absorbance wavelengths (B) Chromatographic separation of a sample of organic tomato sample without addition of pesticides.

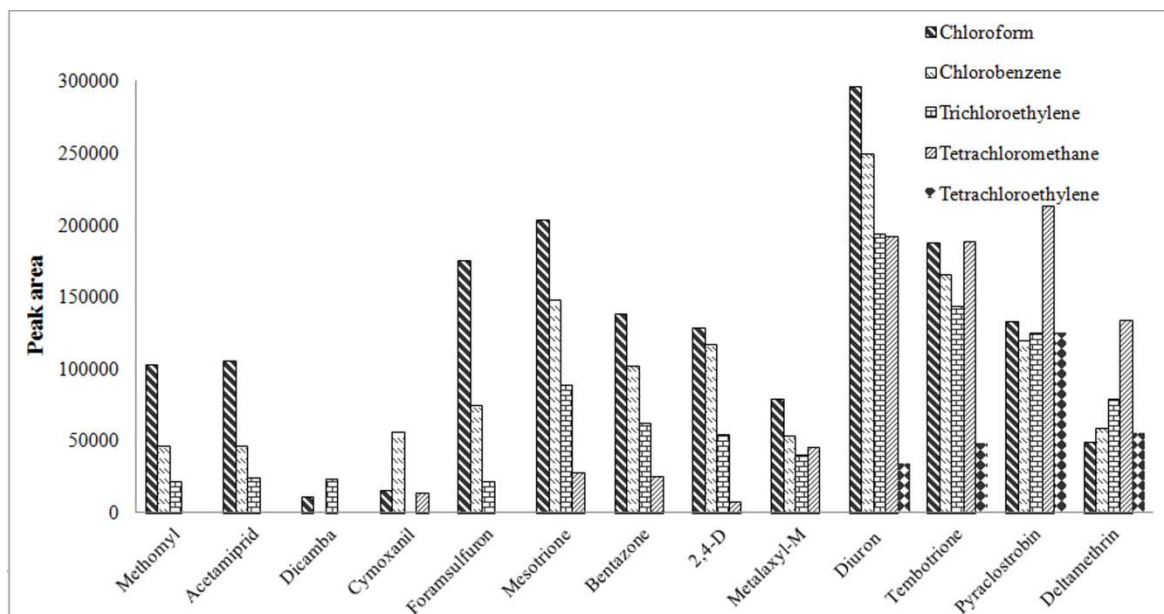


Fig. 2 - Effect of different extraction solvents on the total chromatographic peak area of pesticides. Extraction conditions: 5 mL of ultra-pure water with 1 mL of MeCN QuEChERS extract obtained with a tomato sample spiked with a concentration of 3.0 mgkg^{-1} for dicamba and metalaxyl-M; 1.5 mgkg^{-1} for 2,4 – D and deltamethrin, 0.150 mgkg^{-1} for the other nine pesticides and 100 μl of each extraction solvent.

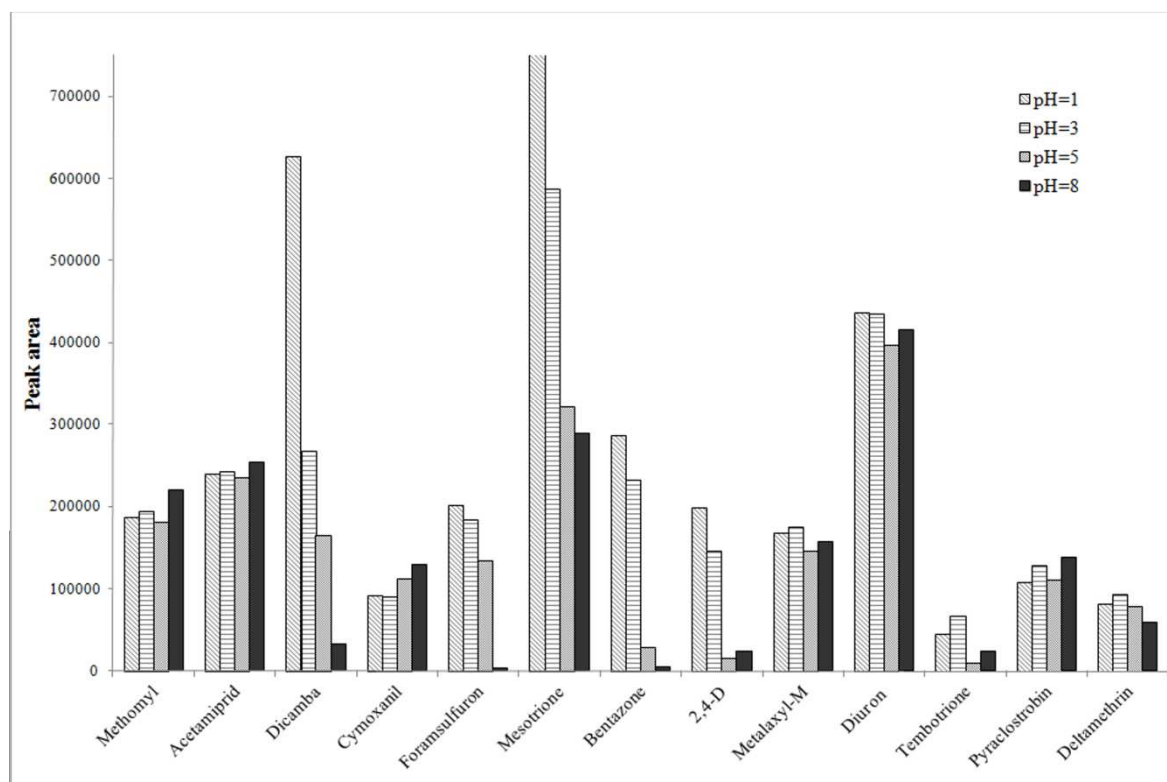


Fig. 3 - Effect of pH from aqueous phase on the total chromatographic peak area of pesticides. Extraction conditions: 5 mL of buffer with 1 mL of MeCN QuEChERS extract obtained with a tomato sample spiked with a concentration of 3.0 mg kg^{-1} for dicamba and metalaxyl-M; 1.5 mg kg^{-1} for 2,4 - D and deltamethrin, 0.150 mg kg^{-1} for the other nine pesticides and 100 μL of chloroform as extraction solvent.

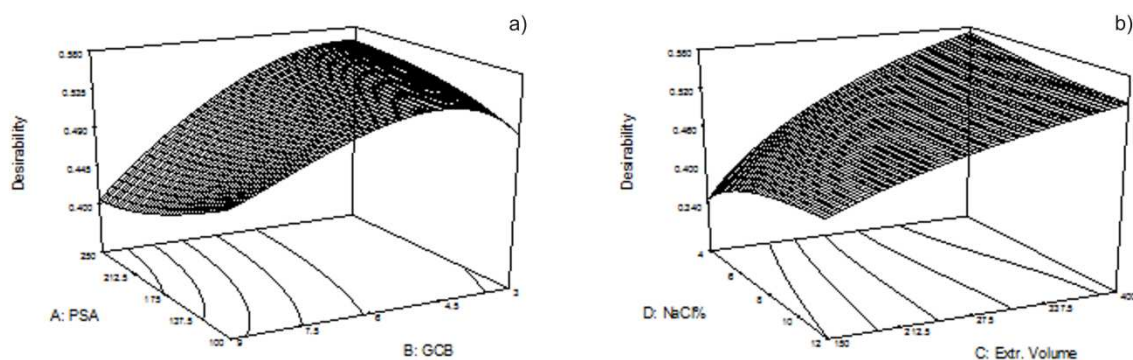


Fig. 4 – Response surface estimated for the central composite design of QuEChERS / DLLME optimization: (a) amount of PSA and GCB); (b) chloroform amount, NaCl percentage

Capítulo 5

Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry

Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry

Armindo Melo¹, Sara C. Cunha¹, Catarina Mansilha^{2,5}, Ana Aguiar³, Olívia Pinho^{1,4}, Isabel

M.P.L.V.O. Ferreira^{1*}

¹REQUIMTE/ Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e

Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

²Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal.

³REQUIMTE/Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

⁴Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

⁵REQUIMTE/Universidade do Porto

* Corresponding author, email: isabel.ferreira@ff.up.pt

ABSTRACT

A multiclass and multiresidue method for pesticide analysis in tomato has been validated. Extraction and pre-concentration of the pesticide residues from acetonitrile extract was performed by using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) technique followed by gas chromatography-mass detection. DLLME was performed using carbon tetrachloride as extractive solvent and acetonitrile extract as dispersive solvent, in order to increase enrichment factor of extraction procedure. Parameters of validation indicated the suitability of the method for routine analyses of thirty pesticides in a large number of samples. In general, pesticide recoveries ranged between 70-110% and repeatability ranged between 1 and 20%. The proposed method was applied to the monitoring of pesticide

levels in tomatoes grown during winter in greenhouses. Among compounds considered in this work, cyprodinil was found in tomato at concentrations of 0.33 mg/kg, other pesticides like azoxystrobin, fenhexanid, tolyfluanid, λ -cyhalothrin and trifloxystrobin were also detected but not quantified.

Keywords: tomato, pesticides, improved extraction procedure, dispersive liquid–liquid microextraction, gas chromatography–mass detection

1. Introduction

Tomatoes (*Lycopersicum esculentum* sin.: *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicum lycopersicum*) belong to the Solanaceae family and corresponds to one of the most widely grown vegetables in the world (Engindeniz, 2006). This fruit vegetable is typically produced in spring-summer season, however, in south Europe it is produced during all year in greenhouses (Bidari, Ganjali, Norouzi, Hosseini, & Assadi, 2011). Thus, consumers can eat fresh tomato, usually in salad dishes that are consumed without cooking treatment, even during winter.

Commercial greenhouses are widely utilized to produce premium-quality fruits and vegetables by providing optimal growth conditions for these plants (Acquaah, 2002). Yet moderate temperature and high humidity accrue plant development it also contributes to pests and diseases spread. Moreover, in greenhouses the cultures follow up each other in a non-stop rotation by the virtually year-round culture of crops, allowing the survival of pests and diseases. Indeed, greenhouse requirements for best tomato production are also favorable for development of fungus diseases as late blight (*Phytophthora infestans*) and grey mould (*Botrytis cinerea*) (Angioni, Porcua, & Dedolab, 2011). Also insects and mites

are ever-present in greenhouses and so, insecticides are widely used in tomato protection programs (Nelson, 1998). For this reason, integrated pest management strategies requires spraying with different types of fungicides and insecticides (Bidari et al., 2011; Acquah, 2002). Consequently, monitoring of pesticide residues in greenhouse tomato becomes essential to ensure food safety to the consumers, preventing bioaccumulation of pesticide residues through the food chain.

Concentrations of pesticides in food commodities such as tomato are normally low. Thus, pretreatment /extraction procedures are required in order to isolate the analytes from the complex tomato matrix, remove interfering compounds and achieve a sufficient sensitivity to guarantee that the detection limits of the method are in agreement with EU legislation requirements, established by maximum residue levels (MRL) (Regulation (EC) N° 396/2005, 2005). Gas chromatography coupled to mass detection is widely used in the analysis of pesticide of high volatility (Likas, Tsiropoulos, & Miliadis, 2007), whereas liquid chromatography is preferred in the analysis of pesticides of low volatility (Sannino, & Bandini, 2005).

Miniaturized sample preparation methods for analyzing pesticide residues in tomato matrix have been reported (Bidari et al., 2011; Angioni et al., 2011; Likas et al., 2007; Sannino, & Bandini, 2005; Lehotay, Son, Kwon, Koesukwiwat, Fu, Mastovska, Hoh, & Leepipatpi boon, 2010). QuEChERS analysis based on acetonitrile extraction of difference classes of pesticide residues widely used to control tomato pests are described (Angioni et al., 2011; Likas et al., 2007; Lehotay et al., 2010). Advantages of this methodology are its flexibility, high degree of selectivity and sensitivity (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003; Lehotaya, Maštovska, Yun, 2005). Its major disadvantage is the low enrichment factors (Cunha, & Fernandes, 2011). Other methodologies enabled higher enrichment factors, namely, single-drop microextraction (SDME) coupled with gas

chromatography applied for multiclass fungicide analyses in tomato (Amvrazi, Papadi-Psyllou, & Tsiropoulos, 2010) and ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and gas chromatography-flame photometric detection (GC-FPD) for determination of organophosphorus pesticides (Bidari et al., 2011).

DLLME is one of the emerging techniques in this area (Rezaee, Assadi, Millani-Hosseini, Aghaee, Ahmadi, & Berijani, 2006; Berijani, Assadi, Anbia, Milani-Hosseini, & Aghaee, 2006). It is based on a ternary component solvent extraction system (i.e. extraction solvent, disperser solvent and aqueous samples containing the analyte of interest) and its main advantages are rapidity, high enrichment factor, low cost and simplicity of operation (Rezaee et al., 2006; Kozani, Assadi, Shemirani, Milani-Hosseini, Jamali, 2007). However, few authors describe the use of DLLME for the extraction of pesticides from solid matrices as maize (Cunha, & Fernandes, 2011), tea leaves (Moinfar, & Milani-Hosseini, 2009), apples (Zang et al., 2008), watermelons and cucumbers (Zhao, Zhao, Han, Jiang, & Zhou, 2007), and bananas (Ravelo-Pérez, Hernández-Borges, Asensio-Ramos, Rodríguez-Delgado, 2009). No application of DLLME in tomato or other fruity vegetable was found in literature.

There is currently an increasing demand for fast and reliable pesticide analytical methodologies, since in routine analytical applications; sample throughput is an important issue to consider in the choice of an analytical method. Combination of acetonitrile-based extraction with DLLME followed by gas-chromatography-mass spectrometry can meet this challenge and be applied in monitoring programs of agriculture and food production.

The objectives of this work were: (i) to set up and validate a multiclass, multiresidue method with appropriate sample clean-up, high enrichment factors and throughput for the analyses of pesticides widely used to control tomato pests; (ii) monitoring the residue

levels of thirty pesticides in greenhouse tomatoes, commercially available in market during winter, by combining acetonitrile-based extraction with DLLME followed by gas-chromatography-mass spectrometry.

2. Material and methods

2.1 Materials and Reagents

Pesticide standards with 93.1% or higher purity grade were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) or Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Purity-corrected individual pesticide stock solutions (1773–7415 µg/mL) were prepared in toluene or acetonitrile (MeCN). A composite stock standard solution of multiple pesticides (600 µg/mL of azoxystrobin, iprodione and tolyfluanid; 300 µg/mL of captan, chlorpyrifos, cyprodinil, cyromazine, difenoconazole, fenhexamid, fludioxonil, folpet, pirimicarb and tebuconazole; 100 µg/mL of bifenthrin, chlorpyrifos-methyl, chlorothalonil, dichlofluanid, (α,β)Endosulfan, kresoxim-methyl, λ-cyhalothrin, metalaxyl-M, tetraconazole, thiamethoxam and trifloxystrobin; 10 µg/mL of atrazine, dimoxystrobin, ethoprophos, picoxystrobin, tefluthrin and vinclozolin) was prepared in MeCN kept with light excluded in a freezer at –18 °C. Internal standard (IS) triphenylphosphate (TPP) with 99.0% of purity was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Individual stock IS solution of TPP was prepared at 20 g/mL in MeCN. Working mixtures of appropriate concentrations were prepared weakly and kept at low temperature in the dark.

Toluene and MeCN were high purity grade solvents for pesticide residue analysis; carbon tetrachloride (CTC) had high purity solvent for GC analysis, all obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Sampling and Sample preparation

Tomato samples were randomly purchased from different supermarkets from coastal region of the north of Portugal during winter. Sampling was performed in accordance with Directive 2002/63/EC (2002). A total number of twenty samples were analyzed comprising varieties from 4 categories usually consumed. Eight beefsteak-tomato samples codified as B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, six grape-tomato-vine samples codified as G1, G2, G3, G4, G5 and G6, five plum-tomato samples codified as P1, P2, P3, P4, and P5 and one sample from cherry-tomato codified as C1.

The pesticides were extracted from tomato using a modified QuEChERS method combined with a DLLME procedure. Unwashed pesticide free fresh tomato sample were chopped using a kitchen hand blender set Silvercrest SSMS 600 B2 Kompernass (Bochum, Germany).

The extraction procedure include the following steps: (i) Weigh representative portion of sample, 10 ± 0.1 g, into a 50 mL centrifuge tube; (ii) add the spiking standard and IS solution and vortex for 1 min to let the pesticides better integrate into samples; (iii) dispense 10 mL MeCN to the samples, seal the tubes and shake the tubes vigorously by hand for 30 s; (iv) transfer to the sample tubes 4 g anhydrous MgSO_4 and 1 g NaCl; (v) cap the tubes and shake them vigorously by hand for 1 min (avoiding formation of oversized MgSO_4 agglomerates); (vi) centrifuge the tubes at 5000 rpm for 5 min; (vii) pick up ± 8 mL of MeCN extract (upper layer) to 15 mL amber vial; (viii) transfer 1 mL of the final extract into the Sarstedt 15mL conical tubes; (ix) to these extract were added 100 μL of carbon tetrachloride and 4 mL ultrapure water; (x) cloudy solution resulted from dispersion of fine droplets of carbon tetrachloride in aqueous solution was formed in the test tube by shaking the tubes vigorously by hand for 1 min; (xi) centrifuge conical tubes at 5000 rpm for 4 min and remove the upper aqueous phase with a pipette (dispersive

particles were sediment at the bottom of the centrifuge tube) (xii) transfer 100 μ L of the settled volume into a vial and inject 1 μ L of the extract in the GC–MS system.

2.3. Validation and quality control

The validation process of the present method was carried out following the SANCO (2010) guidelines. Calibration curves and respective linearity parameters were obtained through matrix-matched calibration. The appropriate volumes of the pesticides spiking mixture and IS were added to blank samples (free of pesticide residues), spiked at six concentration levels. Calibration curves were constructed by plotting the analytes/TPP ratio obtained against the concentration of analytes. The appropriate volume of MeCN was adjusted to give consistent total volume in centrifuge tube. For comparison, calibration curves were also obtained by analysis of standard solutions prepared in solvent (MeCN) in the same concentration ranges to assess the matrix effects.

Recovery and repeatability studies were developed in samples that were confirmed as not containing the target pesticide residues. These samples were spiked with the appropriate amounts of the target compounds at two concentration levels (designated as 1 and 2). Each tube was kept at room temperature for 15 min prior to the addition of the extraction solvents. Spiked tomato samples were subjected to extraction procedure following the procedure described above. Six replicates were performed per day at each concentration level for two different operating days.

2.4. Apparatus and GC–MS conditions

The gas chromatograph 6890N (Agilent, Little Falls, DE, USA) equipped with an electronically controlled split/splitless injection port and a 7683B series

injector/autosampler was interfaced to a single quadrupole inert mass selective detector (5975N, Agilent) with electron impact ionization chamber.

GC separation was performed on a DB-5MS column (30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium was the carrier gas with a ramped pressure starting at 150 kpa held for 1.0 min and ramped at 2.2 kpa/min to 367.1 kpa. The injection was made in splitless mode (0.5 min) and the injector temperature was 280 °C. The glass liner was fitted with a carbofrit plug from Restek (Bellefonte, PA, USA). The oven temperature program was as follows: 80 °C held for 2.0 min, ramped to 180 °C at 20 °C/min, ramped to 230 °C at 5 °C/min, ramped to 280 °C at 20 °C/min, and finally ramped to 300 °C at 40 °C/min and held for 3.0 min. The MS transfer line temperature was held at 280 °C. Total run time was 23 min. Mass spectrometric parameters were set as follows: electron impact ionization with 70 eV energy; ion source temperature, 230 °C and MS quadrupole temperature, 150 °C. The MS system was routinely set in selective ion monitoring (SIM) mode and each compound was quantified based on peak area using one target and one or two qualifier ions. Agilent Chemstation was used for data collection/processing and GC–MS control.

3. Results and discussion

3.1. Sample extraction procedure

A liquid partitioning with acetonitrile (modified QuEChERS) combined with DLLME method was used for extraction, cleanup and preconcentration of thirty pesticides widely used to control tomato pests. Sample preparation procedure was selected to ensure that all pesticides could be analyzed above their MRL (Regulation (EC) N° 396/2005, 2005) (Table 1).

The QuEChERS method used was a modified version from literature for sample preparation of vegetables (Anastassiades et al., 2003). This procedure was used as first step extraction procedure of pesticide compounds from matrix. It involves one initial phase for extraction of a representative portion (10 g of tomato sample) with 10 mL MeCN, followed by liquid-liquid partitioning through addition of 4 g anhydrous MgSO_4 plus 1 g NaCl. The MeCN is a good extraction solvent in low fatty matrix because it gives high recoveries of a wide polarity range of pesticides and does not significantly dissolve the interfering compounds present in this matrix (Lehotaya et al., 2005).

DLLME was performed using CTC as extractive solvent and the extract obtained by QuEChERS as dispersive solvent, in order to increase enrichment factor of extraction procedure and, consequently, allow the detection of the thirty pesticides under study. The DLLME method was based in a previous study applied to the determination of different pesticides in maize (Cunha, & Fernandes, 2011). In this study 1 mL of the final extract of QuEChERS was extracted with 100 μL CTC in 4 mL of ultrapure water.

Typical chromatograms obtained for blank samples (free of pesticide residues) spiked with a mixture of thirty pesticides and IS and a real analyzed sample are presented in Figure 1. The combination of QuEChERS with DLLME enables a rapid and inexpensive sample pretreatment that ensures high enrichment factor and lower detection limits. Using this sample preparation procedure a large number of samples can be analyzed within a working day, thus it is an alternative methodology for routine determination of pesticides in tomato samples.

3.2. Method validation

Different components from matrix can be co-extracted with interest compounds causing matrix effects. Interfering material usually passes through the column along with the

pesticide residues. However, some co-extracted compounds are adsorbed on the glass liner and the liner itself contains active sites that interact with the more polar chemicals in the injected sample. Additionally, the nonvolatile matrix material also can make a layer of active surface that causes diminishment or enhancement in the response (Koesukwiwat, Lehotay, Miao, & Leepipatpiboon 2010), responsible for matrix effects during GC–MS determination. The most common method of reduce the matrix effects is the use of matrix-matched calibration.

Matrix effects were evaluated by comparison of the relative detector responses to the ratio of the calibration curves slopes obtained from matrix matched standard solutions and direct injection of MeCN solutions. Matrix effects can be classified depending on the decrease/increase in the percentage of the slope: between $\pm 20\%$ and 0% represents a mild effect, between $\pm 50\%$ and $\pm 20\%$ is considered a medium effect and higher than $\pm 50\%$ is considered a strong effect of signal suppression or enhancement. According to this classification analytes were categorized into groups (Figure 2). Results showed significant matrix effects for almost all compounds. Only nine analytes showed a mild effect, seven presented medium effect and 14 presented a strong effect, of which three (thiamethoxam, pirimicarb, metaxyl-M) have a strong suppression and 11 shown a strong enhancement, mainly folpet and difenoconazole.

Calibration curves have been obtained in SIM mode and linearity was studied calculating the correlation coefficient, r^2 , of the linear regression equations. Linearity range of concentration for each pesticide is presented in Table 2. These levels were defined taking in account the minimum calibration levels corresponding to the MRLs established in EU (Regulation (EC) N° 396/2005, 2005). Calibration curves were done using six matrix-calibration standards prepared under the same conditions applied to the samples and injected in triplicate.

Calibration graphs showed linearity for the concentration range of all target compounds. Good correlation coefficients equal to or higher than 0.9954, were achieved for all compounds, as it can be observed in Table 2

The quantification limits (LOQs) and detection limits (LODs) were calculated based on the standard deviations of the intercept and calibration curve parameters (Miller, & Miller, 2005). Good LODs were achieved in the range 0.0027 and 0.2523 mg/kg, under the optimized experimental conditions. Also good LOQs were obtained in the range 0.0089 and 0.8412 mg/kg in tomato samples (Table 2). These limits were all in agreement with legislative requirements set by UE for these pesticides in tomato (Table 1).

The recovery and repeatability validation experiments were conducted in tomato matrix at two spiking levels for each pesticide. Results are presented in Table 3. These experiments were performed six times according sample preparation described above. Table 3 shows average of recoveries and repeatability (expressed as relative standard deviation (RSD)). Recoveries for all pesticides (except vinclozolin and thiamethoxam) ranged between 70-110% at both spiking levels being in agreement with the requirements of SANCO (2010). RSD ranged between 1 and 20%. Thus, repeatability also complied with SANCO because it was lower than 20% for all pesticides under study, except for cyromazine and difenoconazole that had a RSD equal to 20%. It should be pointed out that these pesticides easily degrade during sample extraction (due to the basic pH conditions employed), during GC injection and in solution (Mastovska, Dorweiler, Lehotay, Wegscheid, & Szpylka, 2010).

3.3. Analysis of tomato samples

The validated analytical method was applied to monitoring 30 pesticide residues in twenty tomato samples from 4 varieties produced in greenhouses. Thirteen samples showed no traces of pesticide residues and only seven samples presented one or two pesticides.

Twenty-four of the thirty pesticides under study were not detected in any sample analyzed. Six pesticide residues were detected (Table 4): two strobilin pesticides (azoxystrobin and trifloxystrobin), one pyrethroid (λ -cyhalothrin), one anilide (fenhexamid), one sulfamide (tolylfluand) and one pyrimidine (cyprodinil). All the pesticide residues found are fungicide with the exception of the λ -cyhalothrin that is an insecticide. The detected residues levels ranged from <LOQ to 0.33 mg/kg as can be seen in the Table 4.

Although, all the positive samples contained pesticide residues below the MRL established by EU legislation, the detection of tolylfluand in two samples reveals some concern because this pesticide is not recommend by Portuguese legislation for tomato. On the other hand, the simultaneous presence of two pesticide residues in tomato samples may suggest that principles of good agriculture practice are not being respected (EFSA, 2010).

This work focused on tomato samples produced during winter in greenhouses, since these tomatoes are generally used without cooking treatment, especially in salad dishes. Additionally, literature data report that tomatoes cultivated in greenhouse conditions had a higher persistence of pesticides than those cultivated in the field. This behavior was reported by other authors for some pesticides, such as, fenhexamid (Angioni et al., 2011), azoxystrobin and cyprodinil (Garau, Angioni, Del Real, Russo, & Cabras, 2002).

Comparing the results obtained in this work with those found in tomatoes samples from other countries it was observed that pesticide residues in tomatoes commercialized in Portugal present lower amounts than those reported in tomatoes from Spain (cypermethrin 0.012 mg/kg and deltramethrin not detected) (Chavarri, Herrera, & Ariño, 2004), France

(chlorothalonil 0.04-0.85 mg/kg and procymidone 0.003-0.09 mg/kg) (Guillet, Fave, & Montury, 2009) and Morocco (cypermethrin 0.04-0.79 mg/kg, deltamethrin 0.01-0.05 mg/kg and dicofol 0.01-1.06 mg/kg). The differences between results from different countries endorse the idea that a deeper and continuous investigation of tomato pesticide residues is necessary in order to guaranty the safety of consumers.

4. Conclusions

The combination of QuEChERS with DLLME enables an inexpensive sample pretreatment that ensures high enrichment factor and low detection limits. The validated methodology is adequate for routine determination since a large number of samples can be analyzed within a working day. In general, results from recovery and repeatability studies were in agreement with official requirements. Twenty-four of the thirty pesticides under study were not detected in any of the twenty samples analyzed. Five residues of fungicides and one insecticide were detected. These residues levels ranged from <LOQ to 0.33 mg/kg.

Acknowledgments

One of the authors (A. Melo) wishes to thank Fundação Ciência Tecnologia the grant SFRH/BD/41764/2007. This work has been supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia through Project PTDC/AGR-ALI/101583/2008 and PEst-C/EQB/LA0006/2011.

References

Acquaah, G. (2002). *Horticulture: principles and practices*. (2nd ed.). New Jersey: Pearson Education.

Amvrazi, E. G., Papadi-Psyllou, A. T., & Tsiropoulos, N. G. (2010). Pesticide enrichment factors and matrix effects on the determination of multiclass pesticides in tomato samples by single-drop microextraction (SDME) coupled with gas chromatography and comparison study between SDME and acetone-partition extraction procedure. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90, 245–259.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431.

Angioni, A., Porcua, L., & Dedolab, F. (2011). Determination of famoxadone, fenamidone, fenhexamid and iprodione residues in greenhouse tomatoes. *Pest Management Science*, DOI 10.1002/ps.2287.

Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani-Hosseini, M. R., & Aghaee, E. (2006). Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1123, 1-9.

Bidari, A., Ganjali, M. R., Norouzi, P., Hosseini, M. R. M., & Assadi, Y. (2011). Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. *Food Chemistry*, 126, 1840-184.

Chavarri, M. J., Herrera, A., & Ariño, A. (2004). Pesticide residues in field-sprayed and processed fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1253–1259.

Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2011). Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7748-7757.

Directive 2002/63/EC (2002) establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin. *Official Journal of the European Union*.

EFSA (2010). Scientific report of EFSA. 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, 8(6):1646

Engindeniz, S. (2006) Economic analysis of pesticide use on processing tomato growing: A case study for Turkey. *Crop Protection*, 25, 534-541.

Garau, V. L., Angioni, A., Del Real, A. A., Russo, M., & Cabras, P. (2002) Disappearance of azoxystrobin, pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil on tomatoes in a greenhouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1929–1932.

Guillet, V., Fave, C., & Montury, M. (2009). Microwave/SPME method to quantify pesticide residues in tomato fruits. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44, 415 - 422.

Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., Miao, S., & Leepipatpiboon N. (2010). High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6692–6703

Kozani, R. R., Assadi, Y., Shemirani, F., Milani-Hosseini, M. R., Jamali, M. R. (2007). Determination of Trihalomethanes in Drinking Water by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction then Gas Chromatography with Electron-Capture Detection *Chromatographia*, 66, 81–86.

Lehotay, S. J., Son, A. K., Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., & Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2548–2560.

Lehotaya, S. J., Maštovskaá, K., Yun, S.J. (2005). Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International*, 88, 630-638.

Likas, D. T., Tsiropoulos, N. G; & Miliadis, G. E. (2007). Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples. *Journal of Chromatography A*, 1150, 208–214.

Mastovska, K., Dorweiler, K., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S., & Szpylka, K. A. (2010). Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5959-5972.

Miller, J.N., & Miller, J. C. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, (5th ed.). England: Pearson Education Limited.

Moinfar, S.; & Milani-Hosseini, M. R. (2009). Development of dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 907–911.

Nelson, P. V. (1998). *Greenhouse operation and management*. (5th ed.). New Jersey: Prentice Hall.

Ravelo-Pérez, L. M., Hernández-Borges, J., Asensio-Ramos, M., Rodríguez-Delgado, M. A. (2009) Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7336-7345.

Regulation (EC) N° 396/2005 (2005). of the European Parliament and of the Council, European Union, Brussels, *Official Journal of the European Union*.

Rezaee, M., Assadi, Y., Millani-Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.

SANCO (2010). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Document No. SANCO/ 10684/2009.

Sannino, A., & Bandini, M. (2005). Determination of fludioxonil and famoxadone in processed fruits and vegetables by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 88, 1822–1826.

Zang, X., Wang, J., Wang, O., Wang, M., Ma, J., Xi, G., & Wang, Z. (2008). Analysis of captan, folpet, and captafol in apples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 749–754.

Zhao, E., Zhao, W., Han, L., Jiang, S., & Zhou, Z. (2007). Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A*, 1175, 137–140.

Table 1: MS conditions for the analysis of 30 pesticides and IS (Time windows (TW) and ions selected in SIM mode, quantification ions in bold), respective molecular weight (MM), maximum residue level in EU legislation (MRL) and retention time (t_R)

	Pesticide	Ions	MM	MRL (mg/kg)	t_R (min)	TW
1	Ethoprophos	158 , 200, 242	242.3	0.02 ^a	6.60	1
2	Atrazine	200 , 215, 173	215.7	0.05 ^a	7.30	1
3	Chlorothalonil	266 , 264, 231	265.9	0.5	7.72	2
4	Tefluthrin	177 , 197, 125	418.7	0.05	7.75	2
5	Pirimicarb	166 , 72, 238	238.3	1	7.90	2
6	Chlorpyrifos-methyl	286 , 263, 125	322.5	0.5	8.14	3
7	Vinclozolin	212 , 285, 188	236.1	0.05 ^a	8.16	3
8	Metalaxyl-M	206 , 249, 279	279.3	0.2	8.34	4
9	Cyromazine	151 , 165, 265	166.2	1	8.48	4
10	Dichlofluanid	123 , 167, 224	333.2	0.3	8.61	4
11	Chlorpyrifos	197 , 314, 258	350.6	2	8.88	5
12	Tetraconazole	336 , 171, 338	307.8	1	9.09	5
13	Cyprodinil	224 , 225, 210	225.5	1	9.34	6
14	Thiamethoxam	132 , 182, 212	291.7	0.2	9.39	6
15	Tolyfluanid	137 , 181, 238	347.3	3	9.49	6
16	Captan	79 , 264, 182	300.6	2	9.50	6
17	Folpet	260 , 117, 130	296.6	2	9.66	6
18	(α,β)Endosulfan	237 , 265, 339	406.9	0.5	9.95	7
19	Picoxystrobin	335 , 145, 303	367.3	0.05 ^a	10.47	8
20	Fludioxonil	248 , 269, 127	248.2	1	10.97	9
21	Kresoxim-methyl	206 , 131, 116	313.4	0.5	11.04	9
22	Iprodione	187 , 189, 244	330.2	5	11.98	9
23	Fenhexamid	97 , 177, 179	302.2	1	12.48	10
24	Trifloxystrobin	222 , 116, 131	408.4	0.5	12.79	11
25	Tebuconazole	250 , 70, 125	372.2	0.1	12.87	11
	TPP (IS)	326 , 215, 170			13.00	11
26	Dimoxystrobin	116 , 205, 295	326.9	0.01 ^a	13.91	12
27	Bifenthrin	181 , 166, 152	422.9	0.2	14.10	12
28	λ -Cyhalothrin	181 , 197, 141	449.9	0.1	15.79	13
29	Difenoconazole	325 , 323, 152	406.2	2	19.35	13
30	Azoxystrobin	344 , 388, 403	403.4	3	19.74	13

^a lower limit of analytical determination

Table 2: Method validation data. Calibration parameters.

		LR (mg/kg)	r^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1	Ethoprophos	0.010-0.100	0.9981	0.0051	0.0171
2	Atrazine	0.010-0.100	0.9972	0.0062	0.0208
3	Tefluthrin	0.010-0.100	0.9973	0.0061	0.0205
4	Chlorothalonil	0.075-1.000	0.9967	0.0726	0.2419
5	Pirimicarb	0.750-3.000	0.9954	0.1987	0.6625
6	Chlorpyrifos-methyl	0.075-1.000	0.9991	0.0380	0.1265
7	Vinclozolin	0.010-0.100	0.9982	0.0050	0.0165
8	Metalaxyl-M	0.075-1.000	0.9984	0.0508	0.1693
9	Cyromazine	0.750-3.000	0.9963	0.1776	0.5922
10	Dichlofluanid	0.075-1.000	0.9988	0.0441	0.1471
11	Chlorpyrifos	0.750-3.000	0.9973	0.1528	0.5096
12	Tetraconazole	0.075-1.000	0.9998	0.0169	0.0565
13	Cyprodinil	0.750-3.000	0.9989	0.0964	0.3214
14	Thiamethoxam	0.075-1.000	0.9986	0.0476	0.1587
15	Tolyfluanid	1.000-6.000	0.9988	0.2523	0.8412
16	Captan	0.750-3.000	0.9966	0.1717	0.5908
17	Folpet	0.750-3.000	0.9963	0.1772	0.5908
18	(α,β)Endosulfan	0.075-1.000	0.9968	0.0711	0.2371
19	Picoxystrobin	0.010-0.100	0.9985	0.0045	0.0151
20	Fludioxonil	0.750-3.000	0.9991	0.0877	0.2924
21	Kresoxim-methyl	0.075-1.000	0.9961	0.0782	0.2608
22	Iprodione	1.000-6.000	0.9986	0.2367	0.7871
23	Fenhexamid	0.750-3.000	0.9957	0.1927	0.6424
24	Trifloxystrobin	0.075-1.000	0.9995	0.0283	0.0942
25	Tebuconazole	0.750-3.000	0.9974	0.1504	0.5013
26	Dimoxystrobin	0.010-0.100	0.9995	0.0027	0.0089
27	Bifenthrin	0.075-1.000	0.9996	0.0257	0.0856
28	λ -Cyhalothrin	0.075-1.000	0.9996	0.0240	0.0800
29	Difenoconazole	0.750-3.000	0.9977	0.1407	0.4690
30	Azoxystrobin	1.000-6.000	0.9989	0.2426	0.8086

LR- linear range, r^2 - correlation coefficient, LOD - limit of detection; LOQ - limit of quantification.

Table 3: Results of the analysis carried out to evaluate the accuracy and repeatability

		Level of Concentration 1			Level of Concentration 2		
		Added amount (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%RSD)	Added amount (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%RSD)
1	Ethoprophos	0.02	83.5	8	0.05	83.3	7
2	Atrazine	0.02	91.9	8	0.05	84.4	9
3	Tefluthrin	0.02	84.9	6	0.05	83.3	7
4	Chlorothalonil	0.10	88.0	7	0.50	82.0	7
5	Pirimicarb	1.00	90.0	8	2.00	83.1	5
6	Chlorpyrifos-methyl	0.10	89.3	6	0.50	83.9	7
7	Vinclozolin	0.02	61.6	16	0.05	98.0	17
8	Metalaxyl-M	0.10	82.4	6	0.50	80.8	5
9	Cyromazine	1.00	75.1	9	2.00	93.3	20
10	Dichlofluanid	0.10	90.3	13	0.50	87.6	7
11	Chlorpyrifos	1.00	84.0	6	2.00	85.5	6
12	Tetraconazole	0.10	87.3	4	0.50	81.4	7
13	Cyprodinil	1.00	85.5	3	2.00	90.5	4
14	Thiamethoxam	2.00	58.9	3	4.00	82.3	5
15	Tolyfluanid	0.10	91.0	5	0.50	93.6	6
16	Captan	1.00	82.7	12	2.00	91.3	7
17	Folpet	1.00	73.3	16	2.00	87.9	11
18	(α,β)Endosulfan	0.10	78.6	5	0.50	87.3	5
19	Picoxystrobin	0.02	79.4	6	0.05	89.5	5
20	Fludioxonil	1.00	88.7	6	2.00	90.7	4
21	Kresoxim-methyl	0.10	82.2	3	0.50	89.4	5
22	Iprodione	2.00	80.2	15	4.00	78.3	5
23	Fenhexamid	1.00	85.6	7	2.00	94.4	5
24	Trifloxystrobin	0.10	88.3	4	0.50	92.5	9
25	Tebuconazole	1.00	93.2	9	2.00	93.9	6
26	Dimoxystrobin	0.02	73.8	8	0.05	92.2	2
27	Bifenthrin	0.10	85.5	2	0.50	90.9	4
28	λ -Cyhalothrin	0.10	92.3	4	0.50	91.8	3
29	Difenoconazole	1.00	106.7	20	2.00	95.2	15
30	Azoxystrobin	2.00	109.3	13	4.00	100.0	15

Table 4: Results obtained for the six pesticides detected in tomato samples

Variety	Samples	Pesticide residues (mg/kg)					
		Azoxystrobin	Fenhexamid	Cyprodinil	Tolyfluand	λ -Cyhalothrin	Trifloxystrobin
“beefsteak-tomato”	B1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B2	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B4	n.d.	n.d.	0.33±0.08	< LOQ	n.d.	n.d.
	B5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
“grape-tomato-vine”	G1	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G2	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.
	G3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
“plum-tomato”	P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	P2	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
	P3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	P4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	P5	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
“cherry-tomato”	C1	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a The remaining twenty-four pesticides under study were not detected in any sample. (n.d.) = not detected, (LOQ) = Limit of quantification.

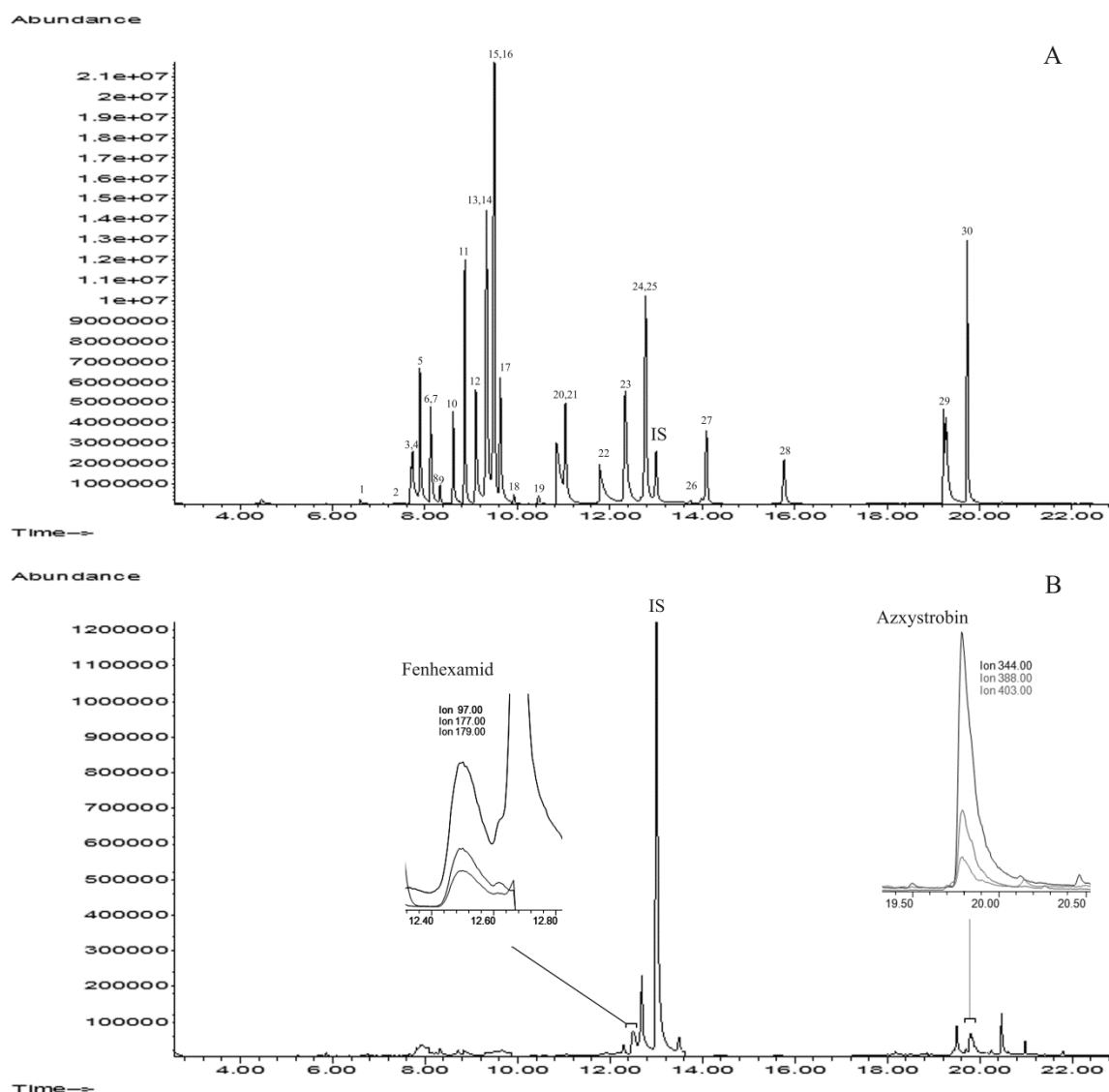


Fig. 1 – (A) GC-MS chromatographic separation of pesticides added to a sample of tomato analyzed in selected monitoring ion mode (each pesticide was fortified at the concentrations level 2 tested in recovery experiments, see Table 4, the legend of peaks is also in Table 4) (B) GC-MS chromatogram of C1 sample with extracted ion chromatograms in SIM mode of Fenhexamid (ions 97, 177, 179) and Azoxystrobin (ions 344, 388, 403).

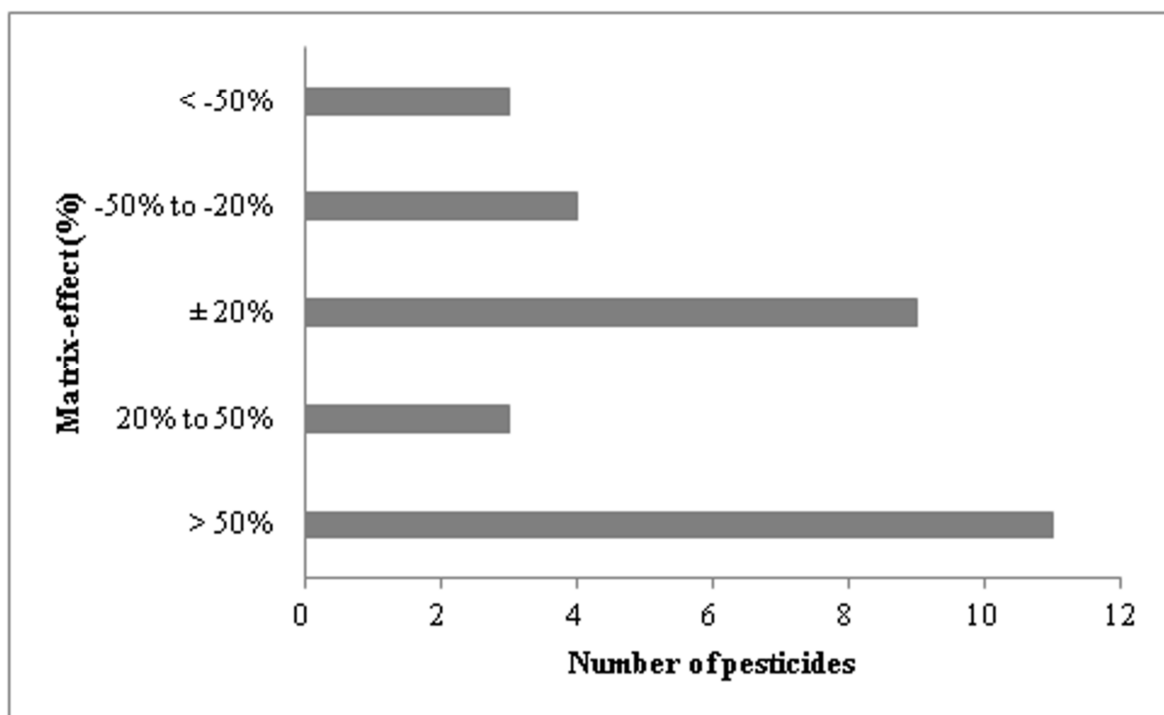


Figure 2 - Distribution of the 30 pesticides according to percentage of matrix effects in tomato samples.

Capítulo 6

6.1. Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality

6.2. Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides

Vegetables Production in NW Portugal, Agriculture Practices and Groundwater Quality

Ana Aguiar¹, Armindo Melo², Catarina Mansilha³ and Isabel Ferreira²

1. REQUIMTE & Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

2. REQUIMTE & Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

3. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Portugal.

Keywords: landscape, water, vulnerable, pesticide, nitrate, well, agriculture

Abstract

In NW of Portugal, the region between Esposende and Vila do Conde was established into a unique system called *masseiras*; *masseiras* are small fields that were created at the beginning of XX century by removing sand from dunes. Since the 80's sand between closed *masseiras* has been removed giving way for larger fields, the "enlarged *masseira* with greenhouses". This region is part of vulnerable zone nº1 (VZ1). Nowadays, the *masseiras* have almost disappeared; they had been replaced by "enlarged *masseiras* with plastic greenhouses" exploited by a new generation of growers. As water quality is an indicator of agriculture practices, 8 wells were selected and water samples were collected on four dates from September 2009 to May 2010. Laboratorial analysis was performed on nitrates and 28 pesticides. The results confirm that water in VZ1 is contaminated with nitrates (as it was expected) and also with pesticides. The water was contaminated in both dug wells and drilled wells all year round. *Masseiras'* wells have more nitrates than greenhouses' wells, probably due to poor agricultural practices used by growers who still employ high quantities of fertilizers and water. Pesticides detected in water samples include some that have been sprayed in the field and others that have not. Some forbidden substances were found. Our results confirm that, in VZ1, there is a diffusion contamination, which origin is unknown. In this communication, we put in picture the history of *masseiras* fields: how *masseiras* fields have been created and how they have disappeared; what trends exist in pest management strategies and the use of fertilizers, pesticides and water resources. These results reinforce the need to change the agricultural system in this region of traditional vegetable production.

INTRODUCTION

The increase of urbanization - together with the fact that vegetables are perishable - strengthens the importance of the location of vegetable production near urban centers. In NW Portugal the aforementioned requirement already exists: the landscape in the region between Esposende and Vila do Conde has been modulated in a unique system called *masseiras*.

The *masseiras* region is part of a classified vulnerable zone regulated by (Directive 91/676/EEC; Dec-Lei nº 235/97; Portaria 556/2003). The *masseiras* region is an important part of VZ1 initially defined by (Portaria 1037/97); later on, VZ1 was enlarged to others counties producing open air vegetables and cattle forage crops (Portaria 1433/2006). Nowadays, the *masseiras* are disappearing, being replaced by "enlarged *masseiras* with plastic greenhouses". The presence of high levels of nitrates is the reason why this zone was classified as vulnerable. This nitrate derives from nitrogen fertilizations and irrigation; vegetable production is the main source of nitrate levels in well water; it has been

estimated an average annual leaching of 306 kg ha⁻¹ of N-NO₃ in open air vegetable production and 193 kg ha⁻¹ in greenhouse vegetable production (Agostinho, 2006).

In VZ1, families' incomes rely on vegetable production: more than 50% of their income is from agriculture (INE, 2001). The production system used in this region since the 60's is based on high inputs of water, fertilizers and pesticides. It is a typical case of industrial agriculture as it can be characterized by agro chemically based, monocultural and market-oriented system: negatively impacting on public health, ecosystem integrity and food quality (Altieri and Nicholls, 2005).

Vegetables commonly cultivated in VZ1 in the open-air are cabbages (*Bassica oleracea* L. var. *costata* and *Bassica oleracea* L. var. *capitata*) and turnip (*Brassica napus*) in winter and lettuce (*Lactuca sativa*), garlic (*Allium sativum*), onion (*Allium cepa*), parsley (*Petroselinum crispum*), carrot (*Daucus carota*) and pumpkin (*Cucurbita pepo*) in spring-summer. In greenhouses the main cultures are lettuce and turnip in winter and tomato (*Lycopersicon esculentum*), sweet pepper (*Capsicum annuum*), green-beans (*Phaseolus vulgaris*) and cucumber (*Cucumis sativus*) in spring-summer.

The production system in this area is very intense - all the area is occupied with vegetables all year round. As a consequence, pest management is exceedingly difficult examples of which are the white fly *Trialeurodes vaporariorum* and the cabbage root fly *Delia radicum* that were once seasonal pests are now active all year round (Aguiar, et al., 2004), probably due to the milder climate and the constant availability of food. The tomato leaf miner *Tuta absoluta* that was seen for the first time in September 2009 (Aguiar, 2011) has, in 2010, spread to the entire region causing huge losses in tomato production.

Due to European policies (Pesticide package, 2007) the number of authorized pesticides is decreasing each year. However, hopefully, the majority of growers do not rely only on pesticides spraying: they do use cultural control such as the use of fences; they grow plants that are resistant to the principal pests in addition to using biological control. This is the way that plant protection is being applied in other European regions as well (Finch and Collier, 2000).

In this communication, we put in picture the history of *masseiras* fields: how *masseiras* fields have been created and how they are disappearing; original drawings are used to help understanding of this unique system of modulating landscape. Laboratorial analysis was performed to evaluate the quality of the water concerning not only nitrates but also pesticides as these are essential indicators to assess water quality.

MATERIAL AND METHODS

Characterization of the Region and Fields

VZ1 has 55 km² of sandy soils classified mainly as Cambisols (28.8%) and Arenosols (24.6%) (Agostinho, 2006). The *masseiras* were established at the beginning of XX century in an area with pine plantations: at that time farmers removed thousands of tonnes of sand, creating small fields which are some metres below the initial level (Fig.1).

As the field is protected from the wind, the climate of the *masseira* resembles that of a greenhouse. Vines were cultivated on the slopes to help stabilise the sand and also to produce grapes for wine. Luckily the ground water is just below the soil (sometimes less than 1 metre) so each field can have its own well with a pump or just a bucket. Water can be accessed easily to irrigate vegetables. Farmers have been obliged to open channels to drain the excess of water after winter rainfall. When a second field is opened, farmers have to negotiate with their neighbours to continue passing through the water that is drained off (Borges, 1990). From 1890 to the middle of the 20th century, almost all the coastline between Esposende and Vila do Conde was transformed, and the dunes gave way for an

important vegetable production area. Farmers start earning a good income – more than 70% work for themselves and families work together.

Since the 80's, the *masseiras* have been disappearing. The high prices paid for sand for civil construction projects has persuaded many farmers to sell it. In the *masseira*, now open and unprotected to the winds, they construct plastic greenhouses. They can easily access the field, and this facilitates the use of a tractor. These are the reasons why *masseiras* have almost disappeared giving way for “enlarged *masseira* with greenhouses” that allows the production of millions of tonnes of vegetables.

Selection of Water Collecting Points

In this study, we have selected 2 dug wells in *masseiras* (BW1 and BW2) and 2 dug wells (BW3 and BW4) and 4 drilled wells (DW1 to DW4) in “enlarged *masseiras* with greenhouses”. Dug wells are 7, 8, 7 and 10 meters deep; drilled wells are 100, 120, 120 and 70 meters deep, and the water is collected from a unconfined aquifer. Water of all selected wells is used for vegetable irrigation. In *masseiras*, water is used for surface irrigation, and irrigation systems are mainly drip and sprinkler irrigation in greenhouses. 7 wells are in VZ1 and 1 (DW2) is outside, near the border. Water samples were collected in September 2009, January, March and May 2010 in fields cultivated with vegetables.

Sampling and Laboratorial Analyses

For each sampling point, we used two different bottles: 1,5 L plastic bottle (for nitrate analyses) and 1L ambar glass bottle pre-rinsed with ultra-pure water (for pesticides analysis). In ambar bottles, the pH of the samples was adjusted at 3 with acetic acid (glacial) to avoid changes in sample composition by degradation processes. Samples were transported to the laboratory within one day. Samples were stored in the dark at 4°C until solid phase extraction was performed within 24 h of their reception in all cases. Chromatographic analyses of pesticides were carried out in a Gas Chromatograph Mass Spectrometer equipped with a fused-silica capillary column coated with 5% diphenylmethylsiloxane (Mansilha et al., 2010). Pesticides were chosen from the list of persistent organic pollutants (POPs) of the Stockholm convention (UNEP, 2005), the priority substances of EU-Decision no. 2455/2001/EC, and also in accordance with Portuguese Legislation (Dec-Lei 506/99, Dec-Lei 306/2007) and ERSAR (2009) in order to comply with the European and Portuguese legislation on water quality. Nitrate analysis was carried out by HPLC with isocratic elution with 0.01M n-octylamine and 20% methanol to pH 6.6 (Pinto et al, 2010).

RESULTS

Results from nitrate analysis are presented in Fig.2. In dug wells, nitrates were detected in all water samples. 50% of them exceeded legal limits of 50 mg/L. It should be pointed out that wells from *masseiras* (BW1 and BW2) were more contaminated than other wells. Two of the 4 drilled wells (DW2 and DW4) had water with low or undetectable nitrate levels. DW1 presented very high nitrate levels in all samples (ranging from 60 and 118 mg/L). DW3 nitrate levels ranged from 22 to 71 mg/L.

Concerning pesticides analysis, from a total of 28 pesticides (8 fungicides, 11 insecticides and 9 herbicides) 5 pesticides were not detected in any sample, acetamiprid (Ac), endrin (E), pendimethalin (Pe), phosmet (Ph) and 2,4D.

Results from occurrence of pesticides in all water samples are summarized in Table 1. From a total of 32 samples, the most frequent fungicides were azoxystrobin (Az) and cyprodinil (Cp), followed by metalaxyl (Mx), folpet (Fo), fludioxonil (Fu). Less abundant were iprodione (I), fenhexamid (Fn) and tolyfluanid (To). The most frequent insecticides were pirimicarb (Pi) and thiamethoxam (Th), followed by dimethoate (Dm), dieldrin (Dd), cyromazine (Cr), DDT, methoxychlor (Mt) and aldrin (Al). Concerning herbicides, the

most frequent were atrazine (Atz) and terbutylazine (T) and their desetil-metabolites (Ad and Td), followed by s-metalachlor (Mt), EPTC and linuron (L).

Some pesticides that are not in use nowadays as they were already excluded from List A (PPDB, 2010) were detected in some samples: aldrin, atrazine, DDT, dieldrin, EPTC, linuron, methoxychlor and s-metolachlor.

Considering the number of pesticides above the limit of quantification (LOQ) in each sample (Table 2) fungicides and insecticides are more frequent in samples from dug wells than from drilled wells while herbicides are less frequent except in the sample from DW1. Between dug wells, there are differences between the wells in *masseiras* that have much more compounds than the others (BW3 and BW4). These two have very similar compounds: just one herbicide in one sample, 3 fungicides and 1 insecticide are present in both wells: probably this is due to local infiltration from the neighbouring fields.

Global statistical analysis for pesticides were carried out by cluster analysis, which was conducted to determine similarities and differences between samples from dug wells and drilled wells according to collection dates (Fig.3). Data were organised with eight rows corresponding to the 4 dug wells and 4 drilled wells and the column vectors (X1, X2, X3, X4) representing the number of pesticides above the LOQ in each collection date. Cluster analysis of the X matrix (obtained from data of Table 2) was carried out using the single linkage method with Euclidean distances, as implemented in the software SPSS for Windows, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), which involves the scaling of distance measures by observed variable ranges. Dug wells samples cluster together and cluster also with the most contaminated drilled well (DW1), whereas the other drilled wells samples formed another cluster (Fig.3).

DISCUSSION

This data shows that water used to irrigate vegetables in VZ1 is contaminated not only with nitrates (as it was expected) but also with pesticides; this correlation was already observed by Silva et al. (2006) and Gonçalves et al. (2007) with respect to other pesticides.

The water was contaminated in both, dug wells and drilled wells all year round. *Masseiras*' wells have more nitrates than greenhouses' wells; the highest levels of nitrates were in spring; this was probably due to poor agricultural practices used by growers who still employ high quantities of fertilizers and water; this situation was already denounced for VZ1 by Agostinho (2006).

The water collected has pesticides that have been sprayed in the field and others that have not. Some forbidden substances were found in water supplies. Searching for pesticides in groundwater has been performed in several agricultural regions in Europe as cited by (Antón et al., 2004; Papadopoulou-Mourkidou et al., 2004). Our results confirm that, in VZ1, there is a diffusion contamination, which origin is difficult to ascertain: because of the questionable agricultural practices of some still to this day, the water available for irrigation is contaminated.

These results reinforce the need for change. Nitrates and pesticides in water are warning signs that the production system must change. *Masseiras* were constructed in the beginning of XX century; at that time growers used sea-weeds as fertilizer. Since the middle of the century the use of chemical fertilizers and pesticides has made the increasing of productions possible and in consequence families' revenue. By the second half of XX century, *masseiras* gave way for enlarged *masseiras* with greenhouses: several young growers have started their activity in this manner and, similar to other regions (Stansly et al., 2004; Weintraub, 2007; Alomar et al., 2006; Altintas and Bal, 2008; Arnó et al., 2008; Naranjo and Ellsworth, 2009), they employ biological controls. Other technologies in pest

management are being adopted in this way towards a true IPM (Thomas, 1999; Finch and Collier, 2000).

But even if the trend is an increasing adoption of IPM, this study shows that this is not enough, and different agricultural systems have to be implemented rapidly in all regions. The application of fertilizers and pesticides has to be reduced noticeably. Although, vegetables going to market need to maintain standards of hygiene and visual acceptability; this is a paradox; society has to adapt, and consumers have to accept less perfect products (Palumbo et al., 2009).

Several researchers believe that change is possible. Carvalho (2006) states that further research to find an alternative system to the green-revolution is needed. Lenteren (2000) states that pesticides in vegetable production will be abandon during this decade even in greenhouses. Solutions such as habitat manipulation techniques including intercropping, undersown non-host plant and vegetation borders referred to by (Hooks and Johnson, 2003) in addition to ecological infrastructure (Boller et al., 2004) should be implemented. A new production system is needed; probably more land should be dedicated to vegetable production: this would guarantee the maintenance of global production and provide the possibility of longer rotations and ecological infrastructures. *Masseira* fields as they were 50 years ago have disappeared, but vegetable production in this area will continue. Demand will not lessen, yet the way of growing vegetables must change.

Acknowledgements

Our thanks to Inês Ramos and growers of Horpozim in Aguçadoura for facilitating the collection of water samples, to Edgar Pinto for nitrates analysis and to Sofia Marques de Aguiar for the original drawing of masseiras. Finally, thanks to Michael Daly for proof-reading the text.

Literature Cited

- Agostinho, J.M. 2006. Avaliação de técnicas para redução das perdas de azoto nos sistemas agrícolas da zona vulnerável do aquífero livre de Esposende e Vila do Conde. Lisboa: PhD thesis. ISA-UTL. 317pp, 2006.
- Aguiar, A. 2011. The arrival of *Tuta absoluta* in Portugal – pest management in tomato has to change. IOBC proceedings of meeting “integrated protection of field vegetable crops”, Integrated Protection of Field Vegetables. IOBC/wprs Bulletin Vol. 65, 2011. pp. 37-42.
- Aguiar, A., Ferreira, A., Martins, D. and Almeida, D. 2004. Eficacia de trampas de huevos de *Delia radicum* (LINNAEUS, 1758.) en nabo: comparación de cinco trampas hechas con material reciclado. Phytoma España. 164: 151-154.
- Alomar, O., Riudavets, J. and Castañe, C. 2006. *Macrolophus caliginosus* in the biological control of *Bemisia tabaci* on greenhouse melon. Biol. control 36: 154-162.
- Altieri, M. and Nicholls, C. 2005. Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture. California: Univ. Berkeley. ISBN 968-7913-35-5.
- Altintas, S. and Bal, U. 2008. Effects of the commercial product based on *Trichoderma harzianum* on plant, bulb and yield characteristics of onion. Scientia Hort. 116: 219-222.
- Antón, A., Castells, F., Montero, J.I. and Huijbregts, M. 2004. Comparison of toxicological impacts of integrated and chemical pest management in Mediterranean greenhouses. Chemosphere 54:1225-1235.
- Arnó, J., Roig, J. and Riudavets, J. 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their prey preference. Biol. control 44: 1-6.

- Boller, E.F., Hani, F. and Poehling H.M. (Eds.). 2004. Ecological infraestruturas: ideabook on functional biodiversity at the farm level. Temperate zones of Europe. IOBC wprs. 1st ed. ISBN 3-906776-07-7.
- Borges, A.J. 1990. Aguçadoura – monografia. Ed. Centro Social Paroquial de Aguçadoura.
- Carvalho, F. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Envir. Science & Policy* 9: 685-692.
- Dec-Lei, 235/97. Protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola. *Diário da República. I Ser.A.203- Julho*.
- Dec-Lei 506/99. Fixa os objectivos de qualidade para determinadas substâncias perigosas. *DR 271/99. Série IA. 20 Nov.*
- Dec-Lei 306/07. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano. *DR. Série I. 164. 27 Ago.*
- Directive 91/676/EEC. Nitrates Directive. <http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/directiv.html>.
- ERSAR. 2009. Pesticidas a pesquisar em 2010 em águas para consumo humano. Lisboa : www.ersar.pt.
- EU-Decision 2455/2001/EC of November 20, that amends the Directive 200/60/EC. *Official Journal of European Communities. L331/1, 2001, Vol. Brussels*.
- Finch, S. and Collier, R. 2000. Integrated pest management in old vegetable crops in northern Europe with focus on two key pests. *Crop Protection*. 19:817-824.
- Gonçalves, C.M., Silva, J.E. and Alpendurada, M. 2007. Evaluation of the Pesticides Contamination of Groundwater Sampled over Two Years from a Vulnerable Zone in Portugal. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6227-6235.
- Hooks, C.R.R. and Johnson, M.W. 2003. Impact of agricultural diversification on the insect community of cruciferous crops. *Crop Protection* 22: 223-238. 2003.
- INE 2001. Recenseamento Geral da Agricultura 1999.
- Lenteren, Van. 2000. Greenhouse without pesticides: fact or fantasy? *Crop Protection*. 19: 375-384.
- Mansilha, C., Melo, A., Rebelo, H., Heitor, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Domingues, V., Pinho, C. & Gameiro, P. 2010. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *J. Chromatog. A.* 1217, 6681-6691.
- Naranjo, S.E. and Ellsworth, P.C. 2009. Fifty years of the integrated control concept: moving the model and implementation forward in Arizona. *Pest Manag Sci* 65: 1267-1286.
- PPDB 2010. Footprint: creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>.
- Pesticide package. 2007. European parliament votes at first reading on pesticide package. www.europarl.europa.eu.
- Palumbo, J.C. and Castle, S.J. 2009. IPM for fresh-market lettuce production in the desert southwest: the produce paradox. *Pest Mgt. Science* 65:1311-1320.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzias, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K. and Vlachou P. 2004. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. *Science Total Envir.* 321: 127-146.

- Pinto, E., Petisca, C., Amaro, L.F., Pinho, O. and Ferreira, I. M.P.L.V.O. 2010. Influence of different extraction conditions and Nitrite in spinach and lettuce. *J. Liquid Chromatography & Related Technologies*. 33:1-12.
- Portaria 556/2003. Programa de acção para a zona vulnerável nº1. área de protecção do aquífero livre entre Esposende e Vila do Conde. *Diario Rep. I Ser.* 12Julh.
- Portaria 1433/2006. Retifica limites das zonas vulneráveis 1 e 5. *Diário Rep. I Ser.* 247. 27Dez.
- Portaria 1037/97. Identificação das zonas vulneráveis. *Diário Rep.* 1 Out.
- Silva, E., Batista, S., Viana, P., Antunes, P., Serôdio, L., Cardoso, A.T., Cerejeira, M.J. 2006. Pesticides and nitrates in groundwater from oriziculture areas of the Baixo Sado region Portugal. *Inter.J.Envirn.Anal.Chem.* 86 (13-15):955-972.
- Stansly, P.A., Sánchez, P.A., Rodríguez, J.M., Cañizares, A., Nieto, A. López-Leyra, M.J., Fajardo, M., Suárez, V. and Urbaneja, A. 2004. Prospects for biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain. *Crop Protection* 23: 701-712.
- Thomas, M. 1999. Ecological approaches and the development of truly integrated pest management. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5944-5951.
- UNEP. 2005. A Guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. United Nations Environment Periodic. www.pops.int.
- Weintraub, P. 2007. Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. *Pest Mgt Science* 63: 733-760.

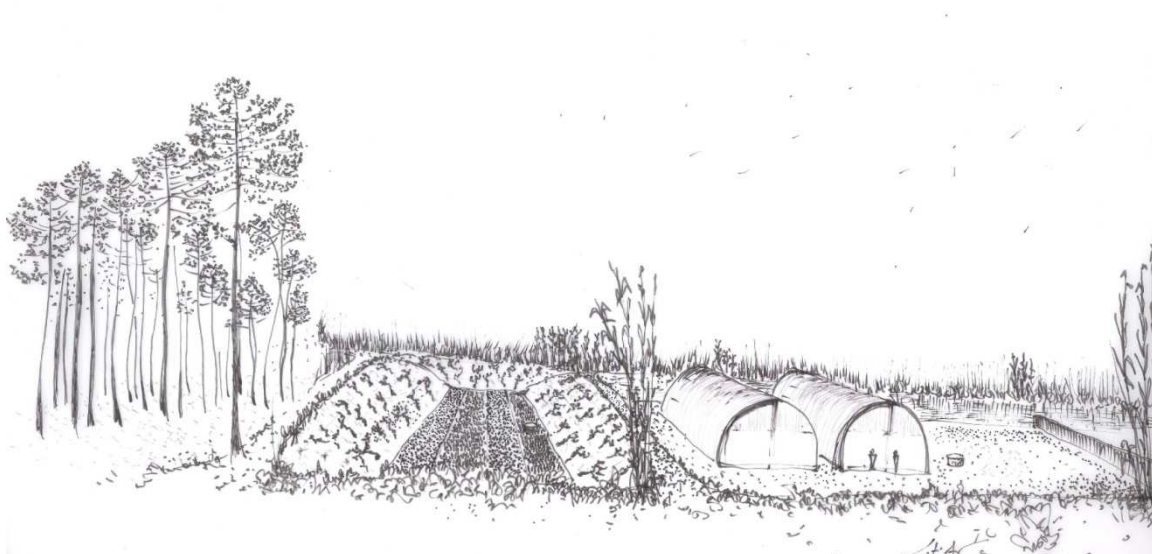


Figure 1. Dunes with pines, *masseira* field as they were at the beginning of XX century and enlarged *masseira* with greenhouse as it has been since 80's.

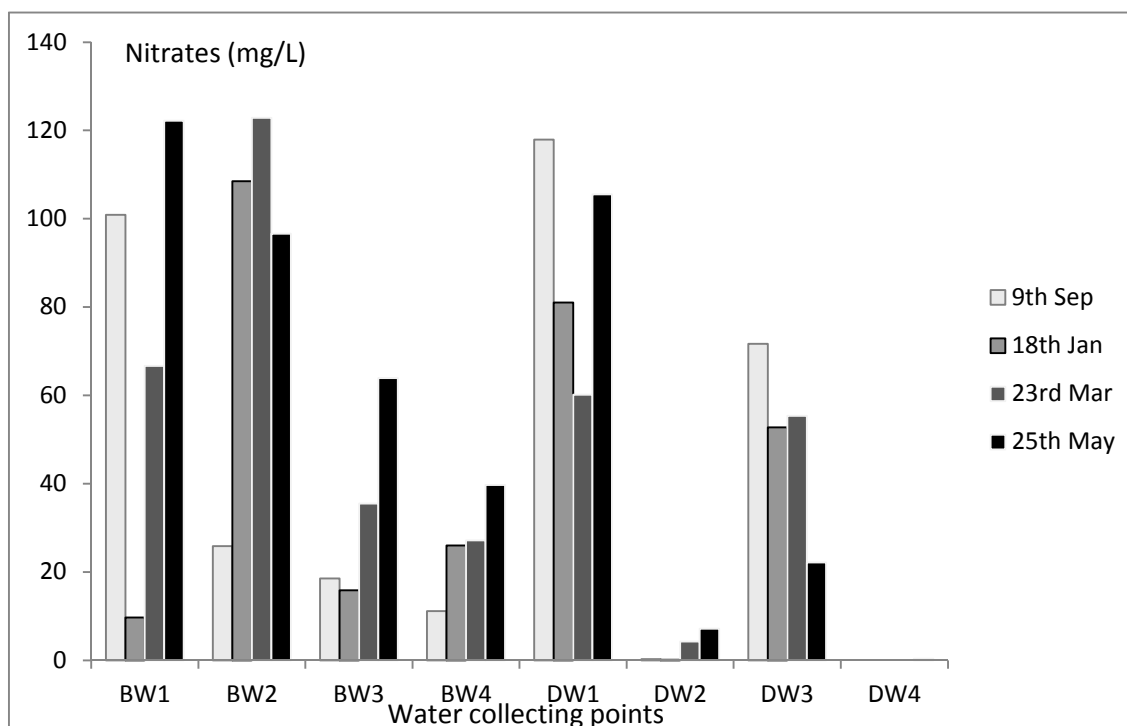


Figure 2. Nitrate content oscillation in bored and drilled wells in each sampling date.

Table 1. Occurrence of pesticides in all water samples (n=32). Limit of detection (LOQ) and limit of quantification (LOQ) are expressed in ng/L.

Abrev.	Pesticides	Use	LOD	LOQ	Number of samples (N)		
					N < LOD	LOD < N < LOQ	N > LOQ
Ac	Acetamiprid	Insecticide	15.6	52.0	32	0	0
Ad	Atrazine-desethyl	Herbicide	8.3	27.6	23	5	4
Al	Aldrin	Insecticide	8.3	27.8	31	0	1
Atz	Atrazine	Herbicide	5.9	19.8	27	1	4
Az	Azoxystrobin	Fungicide	5.7	19.2	14	10	8
Cp	Cyprodinil	Fungicide	0.6	2.1	14	0	18
Cr	Cyromazine	Insecticide	7.0	23.2	29	1	2
Dd	Dieldrin	Insecticide	5.9	19.5	29	1	2
DDT	o,p`-DDT	Insecticide	4.7	15.6	30	1	1
Dm	Dimethoate	Insecticide	4.8	16.1	26	0	6
E	Endrin	Insecticide	8.4	28.2	32	0	0
EPTC	EPTC	Herbicide	8.6	28.6	30	0	2
Fn	Fenhexamid	Fungicide	19.0	63.5	30	0	2
Fo	Folpet	Fungicide	16.7	55.8	21	5	6
Fu	Fludioxonil	Fungicide	4.7	15.6	23	4	5
I	Iprodione	Fungicide	6.7	22.2	29	1	2
L	Linuron	Herbicide	7.9	26.4	30	2	0
Mc	Methoxychlor	Insecticide	7.5	24.9	31	0	1
Mt	S-Metolachlor	Herbicide	19.9	66.3	29	3	0
Mx	Metalaxyl	Fungicide	9.9	33.1	20	1	11
Pe	Pendimethalin	Herbicide	7.6	25.4	32	0	0
Ph	Phosmet	Insecticide	13.90	46.20	32	0	0
Pi	Pirimicarb	Insecticide	1.3	4.4	13	3	16
T	Terbuthylazine	Herbicide	3.7	12.3	24	4	4
Td	Terbuthylazine-desethyl	Herbicide	3.5	11.5	26	0	6
Th	Thiamethoxam	Insecticide	6.4	21.2	18	0	14
To	Tolyfluanid	Fungicide	12.4	41.2	31	0	1
2,4-D	2,4-D	Herbicide	5.8	19.5	32	0	0

Table 2. Number of pesticides above the limit of quantification (LOQ) present in each sample.

Sample	Fungicides				Insecticides				Herbicides				Detected compounds
	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	
BW1	1	3	2	4	1	1	2	3	0	0	1	0	Az+Cp+Dm+EPTC+Fn+Fo+Mx+Pi+Tm+To
BW2	2	3	3	3	3	4	2	2	1	2	1	0	Ad+Atz+Az+Cp+Cr+Dm+Fo+Mc+Mx+Pi+T+Th
BW3	3	2	2	2	2	3	1	2	0	0	0	1	Az+Cp+Dd+ Fo+I+Mx+Pi+ Th
BW4	1	2	2	1	1	4	3	2	0	0	0	0	Az+Cp+DDT+Dm +Mx+Pi+Th
DW1	4	1	1	5	0	0	0	2	1	4	4	4	Ad+Atz+Az+Cp+ Fn+Fo+Fu +I +Pi+Th+T+Td
DW2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	Cp+ EPTC+ Pi
DW3	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	Al+Cp+Cr+Th
DW4	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	Cp+Dm+Fu

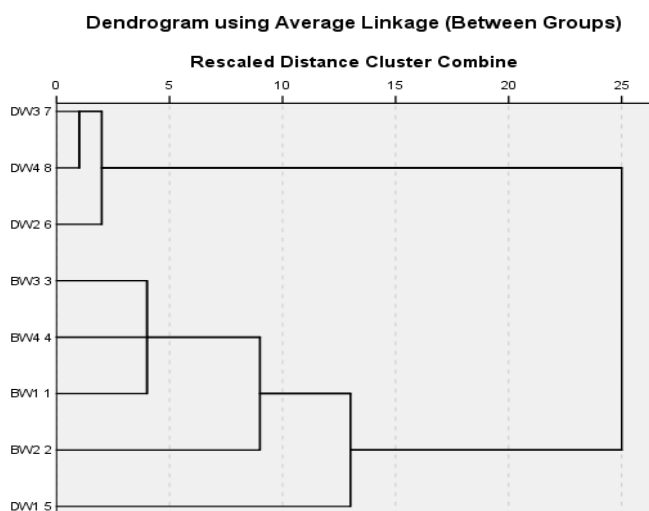


Figure 3. Dendrogram obtained from cluster analysis of dug wells and drilled wells according to pesticides quantified in each collection date.

Impact of intensive horticulture practices on groundwater content of nitrates, sodium, potassium, and pesticides

Armindo Melo · Edgar Pinto · Ana Aguiar ·
Catarina Mansilha · Olívia Pinho ·
Isabel M. P. L. V. O. Ferreira

Received: 17 December 2010 / Accepted: 27 July 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract A monitoring program of nitrate, nitrite, potassium, sodium, and pesticides was carried out in water samples from an intensive horticulture area in a vulnerable zone from north of Portugal. Eight collecting points were selected and water-analyzed in five sampling campaigns, during 1 year. Chemometric techniques, such as cluster analysis, principal component analysis (PCA), and discriminant analysis, were used in order to understand the impact of

intensive horticulture practices on dug and drilled wells groundwater and to study variations in the hydrochemistry of groundwater. PCA performed on pesticide data matrix yielded seven significant PCs explaining 77.67% of the data variance. Although PCA rendered considerable data reduction, it could not clearly group and distinguish the sample types. However, a visible differentiation between the water samples was obtained. Cluster and discriminant analysis grouped the eight collecting points into three clusters of similar characteristics pertaining to water contamination, indicating that it is necessary to improve the use of water, fertilizers, and pesticides. Inorganic fertilizers such as potassium nitrate were suspected to be the most important factors for nitrate contamination since highly significant Pearson correlation ($r=0.691$, $P<0.01$) was obtained between groundwater nitrate and potassium contents. Water from dug wells is especially prone to contamination from the grower and their closer neighbor's practices. Water from drilled wells is also contaminated from distant practices.

Keywords Intensive horticulture · Pesticides · Nitrates · Groundwater · Chemometric analysis

A. Melo · E. Pinto · O. Pinho ·
I. M. P. L. V. O. Ferreira (✉)
REQUIMTE/Departamento de Ciências Químicas,
Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto,
Porto, Portugal
e-mail: isabel.ferreira@ff.up.pt

A. Aguiar
REQUIMTE/Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto,
Porto, Portugal

C. Mansilha
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge,
Porto, Portugal

O. Pinho
Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da
Universidade do Porto,
Porto, Portugal

C. Mansilha
REQUIMTE/Universidade do Porto,
Porto, Portugal

Introduction

Groundwater is a valuable natural resource and as such should be protected from deterioration and

chemical pollution. The quality of groundwater, concerning nitrate, and pesticides content is assessed in the European Union (Directive 2006/118/EC, 2006). Groundwater is considered to have a good chemical quality when nitrate levels do not exceed 50 mg/l, while those of pesticides and their metabolites do not exceed 0.1 µg/l (a total of 0.5 µg/l for all pesticides measured).

Nevertheless, other parameters concerning groundwater composition are important, namely the content of sodium and potassium that rarely exceeds 100 mg/l (Na) and 90 mg/l (K), respectively. Na/K ratio in weakly mineralized water usually ranges from 0.2 to 0.9, but the ratio, usually, increases along rising mineralization (usually up to 30–200) (Szymanska-Pulikowska 2008).

Pollution by intensive agriculture practices is a major risk to the planet's groundwater resources (Bouwer 2000; Chowdary et al. 2005; Kundu et al. 2009). The changes in agricultural practices during twentieth century (use of fertilizers, simplification of the landscape, mechanization, drainage) have significantly contributed to increase the concentrations of pollutant substances in groundwater whose main sources of pollutants are agrochemicals, fertilizers, and salts contained in irrigation leaching.

In NW Portugal, a small region between Esposende and Vila do Conde is dedicated to intensive horticulture practices. This region is included in a vulnerable zone (VZ1) regulated by Council Directive 91/676/EEC (1991) and Portaria 556/2003. Vulnerable area no. 1 is delimited by the Atlantic Ocean on the west, A28 highway on the east, the river Cávado, and river Ave on the north and south, respectively, with an encoded area of 55 km². The high level of nitrates is the reason why this zone was classified as vulnerable. Nitrates present in well's water comes from nitrogen fertilizers used in agriculture mainly in vegetable production, but in VZ1, there are also counties used for cattle and cattle forage crops (Agostinho 2006). Additionally, some reports correlate the concentrations of nitrate with those of pesticides (Silva et al. 2006; Squillace et al. 2002; Gonçalves et al. 2007); thus, groundwater pesticide contamination is also a relevant topic to be investigated.

Vegetables commonly cultivated in VZ1 in the open-air are cabbages (*Bassica oleracea* L. var. *costata* and *B. oleracea* L. var. *capitata*) and turnip (*Brassica napus*) in winter and lettuce (*Lactuca sativa*), garlic (*Allium sativum*), onion (*Allium cepa*),

parsley (*Petroselinum crispum*), carrot (*Daucus carota*), and pumpkin (*Cucurbita pepo*) in spring–summer. In greenhouses, the main cultures are lettuce and turnip in winter and tomato (*Lycopersicon esculentum*), sweet pepper (*Capsicum annuum*), green beans (*Phaseolus vulgaris*), and cucumber (*Cucumis sativus*) in spring–summer. The production system used in this region since the 1960s is based on high inputs of water, fertilizers, and pesticides. It is a typical case of industrial agriculture as it can be characterized by agrochemically based, monocultural, and market-oriented (Altieri and Nicholls 2005). Pest management is exceedingly difficult.

Greenhouse mild temperatures and high humidity promotes fungi and insect development. Key pests in horticulture are the diseases downy mildew and *botrytis* gray mold and the insects aphids. Growers prevent these pests using authorized fungicides and insecticides (azoxystrobin, acetamiprid, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, metalaxyl, pirimicarb, and thiamethoxam). In general, herbicides are not required since black plastics are used to prevent weeds.

Regular monitoring programs are required for reliable estimates of pollutants and to study variations in the hydrochemistry of groundwater (Andrade et al. 2005; Singh et al. 2005). Consequently, a complex data matrix is obtained including a large number of parameters, which are often difficult to highlight meaningful conclusions (Wunderlin et al. 2001; Simeonov et al. 2003). The multidimensional data analysis methods are very attractive in environmental studies dealing with measurements and monitoring, looking for possible grouping and sources of data variation.

The most common multidimensional data analysis methods used are cluster analysis (CA), factor analysis/principal component analysis (FA/PCA), and discriminant analysis (DA) which have been used to identify important components/sources that explain the variations in water quality and influence the water system. Usually, CA is carried out to reveal specific links between collecting points, while FA/PCA is used to identify distribution of pollutants on environmental systems (Singh et al. 2005; Gangopadhyay et al. 2001). In contrast to the exploratory features of CA, DA provides statistical classification of samples, and it is performed with previous knowledge of groups or clusters such as temporal or spatial grouping of

samples. DA helps in grouping samples with common properties.

The application of such tools is expected to help rationalize confused intrinsic associations within real data and give an insight to identify the pollution sources for effective water resource management and pollution control. The present study attempts to understand the impact of intensive horticulture practices on groundwater pollution in a vulnerable zone. For this purpose nitrates, nitrites, sodium, potassium, and pesticides concentration in groundwater from dug and drilled wells was monitored during 1 year to examine the distribution of the compounds under study and identify areas and sources of contamination.

Material and methods

Background of the studied area

From 1890 to the middle of the twentieth century, the coastline between Esposende and Vila do Conde was modulated in a unique system used for vegetable production called *masseiras*. Previously, it was an area with pine plantation. Farmers removed thousands of tonnes of sand, creating small fields some meters below the initial level. These fields were protected from the wind, and the climate of the *masseira* resembles that of a greenhouse. Vines were cultivated on the slopes to help stabilize the sand and also to produce grapes for wine. As, in general, the groundwater is just below the soil, each field could have its own well and with a pump, or just a bucket, water could be carried easily to the field to irrigate vegetables. Farmers have been obliged to open channels to drain the excess of water after winter rainfall.

Since the 1980s, the *masseiras* are disappearing. The high prices paid for sand, for construction projects, force farmers to sell it. In *masseiras*, now open and unprotected to the winds, they constructed plastic greenhouses. They can easily access the field which facilitates the use of tractors. These are the main reasons why *masseiras* have almost disappeared given place to “enlarged *masseiras* with greenhouses” that allows the production of millions tones of vegetables. To have high productions, growers have been using large amounts of water, fertilizers, and pesticides.

VZ1 has 55 km² of sandy soils classified mainly as Cambisols (28.8%) and Arenosols (24.6%) (Agostinho 2006). A dry season can be distinguished from April to September and a wet season lasting approximately from October to March accounting for around 75% of total annual rainfall (Gonçalves et al. 2006).

Selection of water collecting points

A map depicting all the VZ1 and the selected sampling sites in *masseiras* region is shown in Fig. 1. In this study, we have selected two dug wells in *masseiras* (BW1 and BW2), two dug wells (BW3 and BW4), and four drilled wells (DW1 to DW4) in “enlarged *masseiras* with greenhouses.” Dug wells are 7, 8, 7, and 10 m deep, respectively, for BW1, BW2, BW3, and BW4; drilled wells are 100, 120, 120, and 70 m deep, respectively, for DW1, DW2, DW3, and DW4. The water of all selected wells is collected from an unconfined aquifer used for vegetable irrigation. In *masseiras*, water is used mainly for surface irrigation, while in greenhouses irrigation systems are mainly drip and sprinkler. Seven wells are in VZ1 and 1 (DW2) is outside, near the border. Water samples were collected in September 2009, January, March, May, and July 2010 in fields cultivated with vegetables. BW3 and DW3, dug and drilled wells, respectively, were located in the same field. The same occurred for BW4 and DW4.

Sampling and analytical work

For each sampling point, we used two different bottles: 1.5 l plastic bottle (for nitrate, sodium, and potassium analyses) and 1 l amber glass bottle pre-rinsed with ultra-pure water (for pesticides analysis). In amber bottles, the pH of the samples was adjusted to 3 with acetic acid (glacial) to avoid changes in sample composition by degradation processes. Samples were transported to the laboratory within one day. Samples were stored in the dark at 4°C until solid phase extraction (SPE) was performed within 24 h from their reception in all cases.

All reagents used were of analytical grade purity. Standard solutions of sodium (1,000 mg/l) and potassium (1,000 mg/l) were supplied by JenWay, England. Certified Reference Material EnviroMAT ES-H-2 CRM was purchased from SCP Science (France).

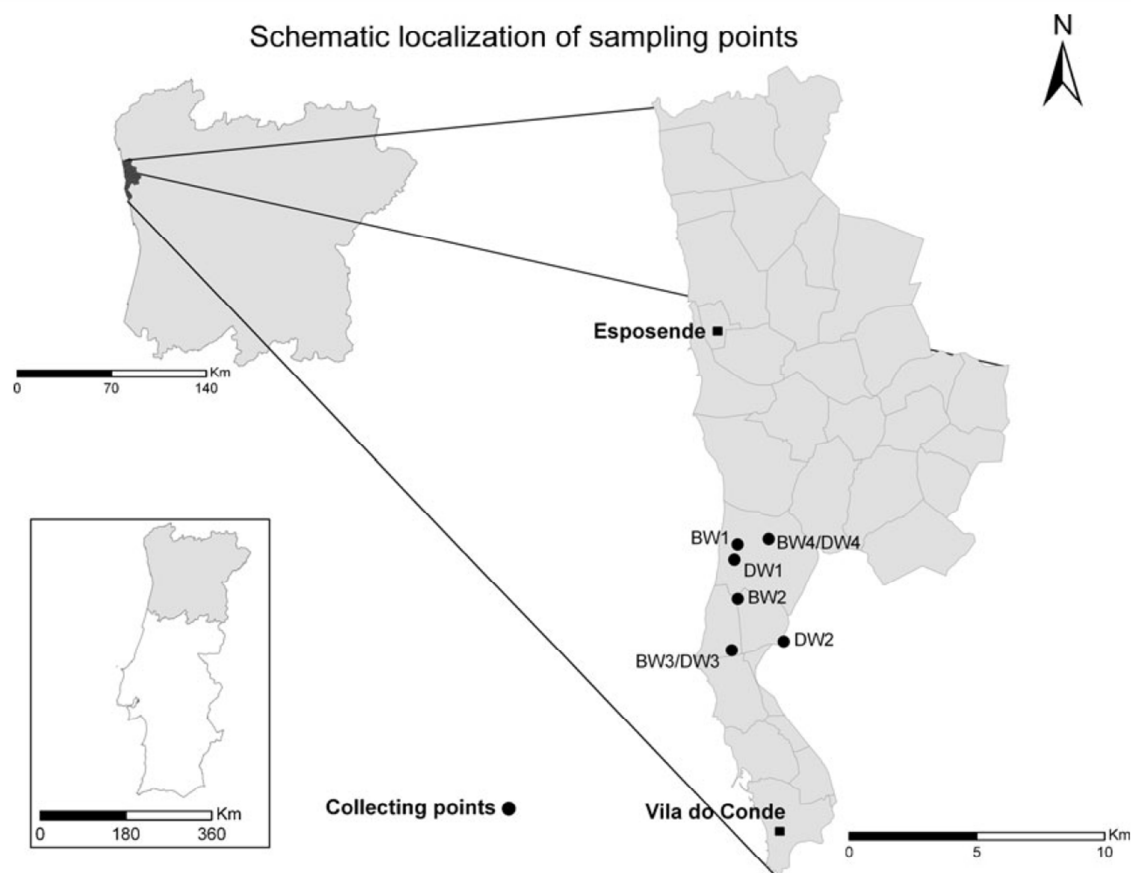


Fig. 1 Map of vulnerable zone no. 1 (VZ1) designed in the framework of the 91/676/EEC Directive and showing the distribution of the collecting points considered in the present

study: four dug wells—BW1, BW2, BW3, BW4 and four drilled wells—DW1, DW2, DW3, DW4

Nitrate and nitrite analyses were carried out by HPLC with isocratic elution with 0.01 M *n*-octylamine and 20% methanol to pH 6.6 (Pinto et al. 2010). Sodium and potassium were quantified by flame photometry (Model PFP7, JenWay, England). Butane gas and air were supplied as the source of flame. The flow rate of fuel was adjusted to get a maximum sensitivity.

Pesticides were extracted by SPE using LiChrolut EN RP-18 SPE cartridges (100 mg/200 mg, 6 ml) from Merck (Darmstadt, Germany), according to the procedure previously described by Mansilha et al. (2010). Briefly, (a) conditioning step, by the sequential addition of 7 ml of ethyl acetate, 7 ml of methanol, and 7 ml of Milli-Q water at a flow rate of 1 ml/min; (b) loading step, by passing 500 ml of the water sample through the cartridge at a flow of 5 ml/min; (c) washing step, by rinsing the cartridge with 5 ml water and dried by vacuum pressure during approximately 60 min; and (d) elution performed with 2×2.5 ml of methanol and 2×2.5 ml acetonitrile, at a flow of

1 ml/min. After elution, the extracts were evaporated to dryness in a rotative evaporator (Buchi/Brinkman Rotavapor RE-111 & Water Bath B-461) and then re-suspended until a final volume of 500 µl in methanol and directly analyzed by GC/MS.

Chromatographic analyses of pesticides were carried out in a gas chromatograph mass spectrometer equipped with a fused-silica capillary column coated with 5% diphenylmethylsiloxane (Mansilha et al. 2010). Twenty-eight pesticides were chosen from the list of persistent organic pollutants of the Stockholm convention (UNEP 2005) and also in accordance with European and Portuguese legislation on water quality (DGADR 2009).

Description of the data set

Limit of quantification (LOQ) is assumed to be the lowest amount of an analyte in a sample that can be quantified with acceptable precision and accuracy

whereas the limit of detection is the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from the background noise but not necessarily quantified as an exact value. Both were calculated based on the calibration curve parameters (Mansilha et al. 2010).

Nitrates, nitrites, sodium, and potassium concentrations were expressed in milligrams per liter. The concentration values of pesticides were expressed in nanograms per liter. Spectral confirmation to ascertain pesticide identity was obtained by single or tandem mass spectrometry. The threshold limit considered to report was the respective limit of quantification. For statistical analysis, some adaptation was needed in order to have quantitative data throughout. Thus, the following criteria were adopted: Nonquantifiable results were considered as zero, since concentrations below the LOQ were considered negligible and meaningless.

Statistical analysis of the monitoring results

Exploration of results was performed by analysis of descriptive parameters, such as frequencies, values above and below a reference limit, etc. Analyses of variance were performed to find similarities and differences between samples. Then, a stepwise multivariate analysis was carried out to display the most significant patterns, looking for possible groupings and sources of data variation, as well as for their temporal and geographical distributions, through resolution and modeling of raw data.

Firstly, an unsupervised technique was applied, cluster analysis, to discover natural groupings within data and highlight similarities and differences between samples from dug and drilled wells according to collection dates. Data were organized with eight rows corresponding to the four dug wells and four drilled wells and the column vectors (X1, X2, X3, X4, X5) representing the frequency of pesticides above the LOQ in each collection date. Cluster analysis of the X matrix was carried out using the single linkage method with Euclidean distances which involves the scaling of distance measures by observed variable ranges.

Secondly, raw data were computed after normalization which involved dividing each value of a given variable by the standard deviation of all the values for this variable over the entire sample collection period. After normalization, all variables had the same weight

because they had a mean of zero and unitary variance. Additionally, all variables that assumed a constant value equal to zero all across the samples and collecting dates were eliminated from any multivariate statistical treatment. With the purpose to reduce the “noise” present in the data, another simplification strategy was adopted: Variables with only one nonzero data value are unsuitable to display a consistent pattern linked to the environmental behavior of the pesticides and were removed from multivariate statistical treatment. These criterion led us to exclude the following pesticides from multivariate analysis: acetamiprid, aldrin, *o,p'*-DDT, endrin, linuron, methoxychlor, S-metalachlor, pendimethalin, phosmet, tolylfluanid, and 2,4D. Consequently, a single matrix was formed by concentration values for each combination of variables (17 pesticides) and cases (40 samples). PCA was applied to reveal the main sources of data variance, and it allows finding out association between variables, thus reducing the dimensionality of the data set.

The PCs are the uncorrelated new variables, obtained by multiplying the original correlated variables with the eigenvector (loadings or weightings). The Bartlett's sphericity test was applied to the correlation matrix of variables for assessing the adequacy of PCA. PCs with eigenvalue >1 were retained. The contribution of each factor at every site (factor scores) was computed, and scores plots of first two PCs (PC1 and PC2) were constructed.

DA was applied to raw data with the objective to distinguish among variables those which have driven the formation of groups of closed related dug and drilled wells, as seen in cluster analysis. The grouping (dependent) variables were those defined by cluster analysis and nitrate, potassium, sodium, and pesticide contents constituted the independent variables. Exploration of data, descriptive statistics, ANOVA analyses, cluster analysis discriminant analysis, and principal component analysis were performed with SPSS for Windows version 18 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results and discussion

Nitrate, nitrite, potassium, and sodium contents in groundwater

During the studied period, the seasonal variation of nitrate, nitrite, potassium, and sodium in groundwater

was followed, showing the dynamic of the levels, which is thought to be dependent of several factors, namely hydrogeological properties of the area, precipitation and cultural practices, particularly fertilization, and irrigation. Mean values and range of concentration during the studied period for nitrate, nitrite, potassium, and sodium organized by collecting points are presented in Table 1.

In dug wells, nitrates were detected in all water samples. Fifty percent of them exceeded legal limits of 50 mg/l. It should be pointed out that wells from *masseiras* (BW1 and BW2) were significantly more contaminated than other wells. Two of the four drilled wells (DW2 and DW4) had water with low or undetectable nitrate levels. DW1 presented very high nitrate levels in all samples (ranging from 60 and 118 mg/l); these levels are similar to those observed in dug wells from *masseiras*, except that in DW1 where 100% of the samples exceeded the limit of 50 mg/l. DW3 nitrate levels ranged from 22 to 71 mg/l. There was also a considerable variability within wells between sampling times. Dry season from April to September can result in concentration of nitrate in groundwater. However, the month of maximal and minimal nitrate values differed between wells indicating lack of recognizable temporal correlation and possible association with field and neighboring cultural practices and irrigation.

Nitrite content was very low or no detectable, and only the most contaminated wells (BW1 and BW2) presented content around 0.1 mg/l. Highly significant Pearson correlation ($r=0.691$, $P<0.01$) was obtained between groundwater nitrate and potassium contents; thus, inorganic fertilizers such as potassium nitrate were suspected to be the most important factor for nitrate contamination. However, other inorganic fertilizers could be used, namely ammonium nitrate, or for example animal manure which are other sources of contamination that can be present as apparent from DW1.

Sodium content of the groundwaters ranged from 17.4 to 92.9 mg/l (Table 1). Samples from DW3 ranged from 127.2 to 166.2 mg/l during the studied period, probably as a result of infiltration from sea water. Salinization due to seawater intrusion is one of the major threats to coastal aquifers (Russak and Sivan 2010) being a limiting factor for certain crops.

Occurrence of pesticides in groundwater

From a total of 28 pesticides (eight fungicides, 11 insecticides, and nine herbicides), five of them were not detected in any sample, acetamiprid, endrin, pendimethalin, phosmet, and 2,4D. Results from occurrence of pesticides in all water samples are summarized in Table 2. From a total of 40 samples, the most frequent fungicides were cyprodinil, metalaxyl, and azoxystrobin, followed by folpet and fludioxonil. Less abundant were fenhexamid, iprodione, and tolyfluanid. The most frequent insecticides were pirimicarb and thiamethoxam, followed by dimethoate, dieldrin, cyromazine, *o,p'*-DDT, methoxychlor, and aldrin. Concerning herbicides, the most frequent were atrazine and terbuthylazine and their desethyl metabolites, followed by EPTC, *S*-metolachlor, and linuron. It should be pointed out that some pesticides that are not in use nowadays as they are not included in EU Pesticides database were detected in some samples: EPTC, atrazine, and terbuthylazine and their desethyl metabolites, *S*-metolachlor, aldrin, dieldrin, *o,p'*-DDT, methoxychlor.

One of the most frequently used indicators to assess the severity of groundwater contamination is given by the percentage of detection above the 100 ng/l limit. From this standpoint, it must be emphasized that metalaxyl and thiamethoxam commonly used fungicide and insecticide, respectively, were detected in more than 20% of the samples, followed by folpet, another used fungicide. Terbuthylazine, terbuthylazinedesethyl, and desethylatrazine characteristic from maize production areas were also detected in 10% of the samples.

Considering the number of pesticides above the LOQ in each sample and the number of samples that contained pesticides above the legal limits (Table 3), fungicides and insecticides are more frequent in samples from dug wells than from drilled wells, while herbicides are less frequent except in the sample from DW1. Regarding dug wells, there are differences between the wells in *masseiras* (BW1 and BW2) that have more pesticides than wells in greenhouses (BW3 and BW4).

The focus of the following statistical analysis was reserved to the compounds effectively quantified in the samples (Table 3). Cluster analysis was performed in order to uncover eventual similarities on pesticide distribution or affinities among water samples. Figure 2

Table 1 Mean values, range of concentration, and the month of maximal and minimal values during 1 year for nitrate, nitrite, nitrite, potassium, and sodium organized by collecting points

Wells	Cropping systems (autumn/ winter–spring/summer)	Nitrate (mg/l)		Nitrite (mg/l)		Potassium (mg/l)		Sodium (mg/l)	
		Mean±SD	Range	Mean±SD	Range	Mean±SD	Range	Mean±SD	Range
BW1	Not cultivated–onion	84.1±47.3 c	9.66–122.2 Jan–May	0.08±0.07 b	0.04–0.17 Sep–Mar	29.6±14.2 c	7.42–41.3 Jan–Jul	31.3±9.99 a	17.4–41.9 Jan–Jul
BW2	Not cultivated–onion	82.0±40.0 c	25.9–122.9 Sep–Mar	0.11±0.039 b	0.07–0.15 May–Mar	61.7±2.90 d	56.9–64.7 Jul–Mar	73.0±7.11 c	61.8–79.7 Mar–Jan
BW3	Tomato–tomato	39.8±23.8 b	15.9–65.1 Jan–Jul	0.02±0.002 a	0.001–0.002 May–Mar	5.00±0.76 a,b	4.30–5.84 Mar–Jul	48.2±29.0 a,b	26.3–92.9 Jan–Jul
BW4	Lettuce, cabbages– tomato, cucumber	25.3±10.3 a	11.1–39.7 Sep–May	0.03±0.013 a	0.02–0.05 Jul–Mar	7.57±0.89 a,b	6.62–8.52 Jul–May	37.9±0.75 a	36.6–38.6 Mar–Jan
DW1	Lettuce–tomato	94.8±23.7 c	60.2–118.0 Mar–Sep	0.02±0.007 a	0.02–0.03 Jul–Mar	15.0±17.7 b	5.94–46.5 Jan–May	51.3±7.04 b	42.6–61.4 Mar–Jul
DW2	Lettuce–lettuce	2.60±3.03 a	0.13–7.14 Jan–May	n.d. a	n.d.	3.04±0.16 a	2.89–3.22 Mar–Jan	46.8±3.38 a,b	43.0–50.3 Jul–Jan
DW3	Tomato–tomato	45.8±20.8 b	22.2–71.7 May–Sep	n.d. a	n.d.	5.49±0.46 a,b	5.12–6.24 Jan–Mar	148±17.0 d	127–166 May–Jan
DW4	Lettuce, cabbages– tomato, cucumber	0.13±0.18 a,b	0–0.33 Sep–Jul	n.d. a	n.d.	2.01±0.12 a	1.88–2.14 Mar–Jan	32.9±3.26 a,b	28.7–36.2 May–Jan

BW1 and BW2—dug wells in *masseiras*; BW3 and BW4—dug wells in greenhouses; DW1 to DW4—drilled wells in greenhouses. Results are expressed as mean±SD and range of concentration of samples collected in September 2009, January, March, May, and July 2010. Detection limits were 0.01 mg/l for nitrate and nitrite and 0.1 mg/l for sodium and potassium. Letters a, b, c, and d in columns following mean±SD indicate significant differences at $P<0.05$ in the Duncan test

n.d. not detected

Table 2 Occurrence of pesticides in all water samples ($N=40$)

Abbreviation	Pesticides	Use	LOD	LOQ	Number of samples (N)			
					$N < \text{LOD}$	$\text{LOD} < N < \text{LOQ}$	$N > \text{LOQ}$	$N > 100 \text{ ng/l}$
Ac	Acetamiprid	Insecticide	15.6	52.0	40	0	0	0
Ad	Atrazinedesethyl	Herbicide	8.3	27.6	28	6	6	4
Al	Aldrin	Insecticide	8.3	27.8	39	0	1	1
Atz	Atrazine	Herbicide	5.9	19.8	32	3	5	1
Az	Azoxystrobin	Fungicide	5.7	19.2	19	10	11	1
Cp	Cyprodinil	Fungicide	0.6	2.1	22	3	16	1
Cr	Cyromazine	Insecticide	7.0	23.2	37	1	2	1
Dd	Dieldrin	Insecticide	5.9	19.5	37	1	2	1
DDT	<i>o,p'</i> -DDT	Insecticide	4.7	15.6	38	1	1	0
Dm	Dimethoate	Insecticide	4.8	16.1	34	0	6	2
E	Endrin	Insecticide	8.4	28.2	40	0	0	0
EPTC	EPTC	Herbicide	8.6	28.6	38	0	2	0
Fn	Fenhexamid	Fungicide	19.0	63.5	37	0	3	3
Fo	Folpet	Fungicide	16.7	55.8	27	5	8	5
Fu	Fludioxonil	Fungicide	4.7	15.6	30	4	6	3
I	Iprodione	Fungicide	6.7	22.2	37	1	2	0
L	Linuron	Herbicide	7.9	26.4	39	1	0	0
Mc	Methoxychlor	Insecticide	7.5	24.9	39	0	1	0
Mt	S-Metolachlor	Herbicide	19.9	66.3	39	1	0	0
Mx	Metalaxyl	Fungicide	9.9	33.1	25	1	14	9
Pe	Pendimethalin	Herbicide	7.6	25.4	40	0	0	0
Ph	Phosmet	Insecticide	13.90	46.20	40	0	0	0
Pi	Pirimicarb	Insecticide	1.3	4.4	19	6	15	0
T	Terbuthylazine	Herbicide	3.7	12.3	32	3	5	5
Td	Terbuthylazinedesethyl	Herbicide	3.5	11.5	32	4	4	4
Th	Thiamethoxam	Insecticide	6.4	21.2	26	0	14	8
To	Tolyfluanid	Fungicide	12.4	41.2	39	0	1	1
2,4-D	2,4-D	Herbicide	5.8	19.5	40	0	0	0

LOD and LOQ values are given in nanograms per liter

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification

presents the dendrogram obtained when clustering samples of dug wells and drilled wells according to frequency of pesticides quantified in each collection date. From observation of Fig. 2, a group composed by DW2, DW3, and DW4 is clearly identified. This association seems logical since it includes three collecting points that presented lower amounts of pesticides. The distribution pattern clearly shows that collection points DW2 and DW3 were characterized by a relatively homogeneous composition, both in time and space. A second cluster includes the samples from

dug wells. Indeed, this group comprises samples that present higher amounts of insecticides and fungicides. The third cluster is formed by samples from one drilled wells that is clearly different from others and presents high amounts of herbicides.

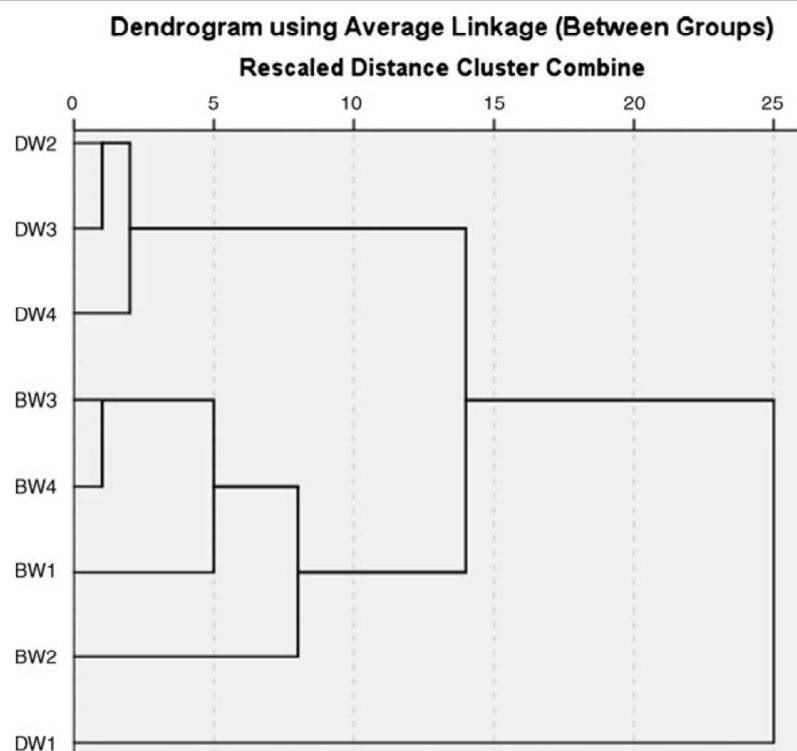
For a more comprehensive insight into the studied area, PCA was performed using the concentrations of the 17 pesticides considered. PCA helps to find out why one sample is different from another, which variables contribute most to this difference, and whether those variables contribute in the same way

Table 3 Pesticides above the limit of quantification present in each sample, arranged by collecting points and dates

Sample	Fungicides							Insecticides							Herbicides							No. of samples		
	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Jul 2010	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Jul 2010	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Jul 2010	Sep 2009	Jan 2010	Mar 2010	May 2010	Jul 2010	Pesticides above 100 ng/l	Sum above 500 ng/l		
BW1 (n=5)	Mx	Mx Cp To	Mx	Az Fn Fo	Fo Mx	Pi	Pi	Dm	Dm	Pi	Pi	–	–	EPTC	–	–	–	–	–	–	–	4	4	
BW2 (n=5)	Az Fo	Cp Fo Mx	Az Fo Mx	Az Fo Mx	Fo Mx	Cr Th	Dm Mc Pi	Pi Th	Pi Th	–	–	–	Atz T	Ad	–	–	–	–	–	–	–	5	3	
BW3 (n=5)	Az Cp I	Cp Fo	Cp Mx	Az	Az	Pi Th	Dd Pi	Th	Dd Th	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	1	
BW4 (n=5)	Cp	Cp Mx	Mx	Mx	Az Mx	Pi	DDT Dm Pi	Dm Pi Th	Pi Th	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	1	
DW1 (n=5)	Az Cp Fu	Cp	Cp	Az Cp Fn Fu	Az Fn Fu	–	–	–	Pi Th	–	–	–	Ad Atz T	Ad Atz T	Ad Atz T	–	Ad Atz T	Ad Atz T	Ad Atz T	Ad Atz T	Ad Atz T	4	4	
DW2 (n=5)	–	Cp	–	–	–	–	Pi	–	–	–	–	–	EPTC	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0	
DW3 (n=5)	–	–	–	–	–	Cr Th	Al	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0	
DW4 (n=5)	Cp	Cp Fu	Cp Fu	Fu	Cp	–	–	Dm	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	1	

BW1 and BW2—dug wells in *masseiras*; BW3 and BW4—dug wells in greenhouses; DW1 to DW4—drilled wells in greenhouses. Abbreviations are used for pesticides and they are those described in Table 2

Fig. 2 Dendrogram produced by cluster analysis of data organized with *eight rows* corresponding to the four dug wells and four drilled wells and the *column* vectors (X1, X2, X3, X4, X5) representing the frequency of pesticides above the LOQ in each collection date. Single linkage method with Euclidean distances was used



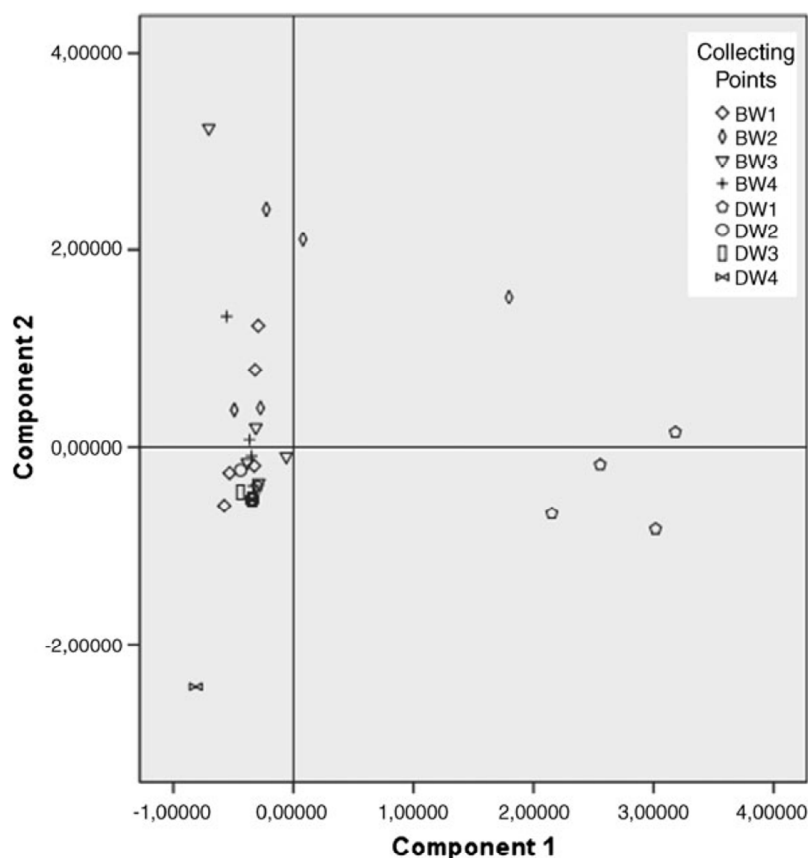
(i.e., are positively correlated) or are inversely correlated. Only factors exhibiting an eigenvalue above 1 were retained. Seven PCs were extracted which account for a total variance of 77.67%. The Bartlett's sphericity test carried out on the correlation matrix of variables show a significant chi-square 793, indicating that PCA can achieve a significant reduction of the dimensionality of the original data set.

Table 4 shows the results of PCA with the eigenvalues, the corresponding amount of variance extracted, and most significant variable loadings. The score plot of the first two PCs is presented in Fig. 3. The PC1 (accounting for 20.89% variance of the total variance) receives a predominant loading from terbutylazine, atrazinedesethyl, terbutylazinedesethyl, atrazine, and fenhexamid. PC1 is almost entirely

Table 4 PCA results for groundwater set

Component	Eigenvalue	Variables	Loadings	Variance (%)
PC1	3.551	Terbutylazine	0.898	20.888
		Terbutylazinedesethyl	0.894	
		Atrazinedesethyl	0.847	
		Atrazine	0.645	
		Fenhexamid	0.643	
PC2	2.594	Thiamethoxam	0.819	15.256
		Folpet	0.752	
		Pirimicarb	0.655	
PC3	1.924	Cyprodinil	0.901	11.315
		Fludioxonil	0.901	
PC4	1.474	Azoxystrobin	0.554	8.672
PC5	1.373	Dieldrin	-0.551	8.079
PC6	1.262	Dimethoate	0.618	7.421
PC7	1.027	Cyromazine	0.658	6.043
		Metalaxyl	-0.556	

Fig. 3 Score plot of the first two PCs performed using the concentrations of pesticides. BW1, BW2, BW3, BW4—dug wells; DW1, DW2, DW3, DW4—drilled wells



related with samples that present quantifiable amounts of two persistent herbicides and respective degradation. These samples were from samples DW1 close to a greenhouse dedicated to lettuce and other vegetables production that does not use herbicides. The source might be neighboring maize fields. This was also observed by other authors (Gonçalves et al. 2007). The second principal component, PC2, was mostly loaded with thiamethoxam, folpet, and pirimicarb and explained 15.26% of the variance. These compounds are widely used in intensive horticulture practices. For example, pirimicarb is a broadly used insecticide mainly sprayed against aphids; aphids are typically a spring pest but, due to climate changes, the mild temperatures observed in autumn and winter permit colonies of aphids almost all year. It is authorized in lettuce, beans, pepper, and potato. Samples from drilled wells, except those from DW1, were located in the third quadrant of the graphic during all sampling collection dates indicating low content of terbutylazine, atrazinedesethyl, terbutylazinedesethyl, atrazine, fenhexamid, thiamethoxam, folpet, and pirimicarb, whereas samples from dug wells were

located on third and second quadrants (BW1, BW3, and BW4) and on second and third quadrants (BW2). Dug well contamination is strongly influenced by

Table 5 Classification functions and matrix for stepwise discriminant analysis of collecting points variation

Standardized canonical discriminant function coefficients				
Parameters	Function			
	1	2		
Nitrates	1.122	−0.747		
Sodium	−0.655	0.791		
Terbutylazinedesethyl	0.889	0.401		
Pirimicarb	−0.605	−0.178		
Classification matrix				
CA groups ^a	% correct	Predicted group membership		
		1	2	3
1	100	15	0	0
2	85	3	17	0
3	80	0	1	4
Total	90	18	18	4

^a Group 1—DW2, DW3, DW4; group 2—BW1, BW2, BW3, BW4; and group 3—DW1

local agricultural practices. Consequently, dug wells located in the same fields than drilled wells showed higher variation on pesticides content throughout the studied period. The third PC (PC3, 11.32%) received loadings mainly from cyprodinil and fludioxonil; this is not particularly surprising, since the active ingredients are found together in fungicide formulations. The fourth PC (PC4, 8.67%) can be mainly explained by azoxystrobin, a fairly employed fungicide, namely for tomato and lettuce. PC5 (8.07%) and PC6 (7.42%) are discerned mainly due to the behavior of two different insecticides, dieldrin (forbidden), and dimethoate (not used in vegetable production), respectively. PC7 (6.04%) is related with cyromazine and metalaxyl. Metalaxyl is a widely used systemic fungicide used for downy mildews. The remaining 22.33% of data variance could not be clearly interpreted, due to great variability of farming practices, narrow neighboring closeness, and high vegetable replacement.

Global statistical analysis of data set

DA was performed with data set comprised of 17 pesticides, nitrate, potassium, and sodium after grouping into three major groups of wells distribution as obtained through CA. The clusters were the three grouping (dependent) variables, while the measured parameters constituted the independent variables. The discriminant functions and classification matrices were obtained by stepwise method. DA rendered the corresponding classification matrices assigning 90% cases correctly using only four discriminant parameters (Table 5). These results suggested that nitrates, sodium, terbutylazinedesethyl, and pirimicarb are the most significant parameters to discriminate between the three different groups of wells (group 1—DW2, DW3, DW4; group 2—BW1, BW2, BW3, BW4; and group 3—DW1). The correct assignments (90%) by DA for the three different site clusters (groups 1, 2, and 3) further confirmed the adequacy of DA and that grouping pattern coincides with previous results from CA. Both CA and DA predict important differences in water composition from drilled wells, except DW1 and dug wells. Thus, CA helped to group the eight collecting points into three clusters of similar characteristics pertaining to water contamination. Extracted grouping information can be of use in reducing the number of sampling sites without missing much information.

Conclusions

In conclusion, cluster and discriminant analysis grouped the eight collecting points into three clusters of similar characteristics pertaining to water contamination. Nitrate and pesticide residues found in groundwater show that improvement of cultural practices are required in zones of intense horticulture production. Inorganic fertilizers such as potassium nitrate were suspected to be the most important factors for nitrate contamination. The most frequent fungicides were cyprodinil, metalaxyl, and azoxystrobin, whereas the most frequent insecticides were pirimicarb and thiamethoxam, followed by dimethoate, dieldrin, cyromazine, *o,p'*-DDT, methoxychlor, and aldrin. The most frequent herbicides were atrazine and terbutylazine and their desethyl metabolites. It should be pointed out that some pesticides not in use nowadays were detected in some samples. Water from dug wells is especially prone to contamination from the grower and their closer neighbor's practices. Water from drilled wells is contaminated from close cultural practices and also from distant practices probably due to the occurrence of an unconfined aquifer below the entire region.

Acknowledgments Our thanks to Inês Ramos and growers of Horpozim in Aguçadoura for facilitating the collection of water samples. Two of the authors (A. Melo and E. Pinto) want to thank FCT (Portuguese Foundation for Science and Technology) for Ph.D. grant SFRH/BD/41764/2007 and SFRH/BD/67042/2009, respectively. This work has been supported by Project PTDC/AGR-ALI/101583/2008.

References

- Agostinho, J. M. (2006). Avaliação de técnicas para redução das perdas de azoto nos sistemas agrícolas da zona vulnerável do aquífero livre de Esposende e Vila do Conde. Ph.D. Dissertation, ISA-UTL, Lisbon.
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2005). *Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture*. Mexico: University of California, Berkeley.
- Andrade, E. M., Palácio, H. A. Q., Crisóstomo, L. A., Souza, I. H., & Teixeira, A. S. (2005). Índice de qualidade de água, uma proposta para o vale do rio Trussu, Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, 36(2), 135–142.
- Bouwer, H. (2000). Integrated water management: Emerging issues and challenges. *Agricultural Water Management*, 45, 217–228.
- Chowdary, V. M., Rao, N. H., & Sarma, P. B. S. (2005). Decision support framework for assessment of non-point-

- source pollution of groundwater in large irrigation projects. *Agricultural Water Management*, 75, 194–225.
- Council Directive 91/676/EEC. (1991). Concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates of agricultural sources. Official Journal of the European Union.
- DGADR. (2009). *Pesticidas a pesquisar em 2010 em águas para consumo humano*. Lisbon: Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural.
- Directive 2006/118/EC. (2006). Protection of groundwater against pollution and deterioration. Official Journal of the European Union.
- Gangopadhyay, S., Gupta, A., & Nachabe, M. H. (2001). Evaluation of groundwater monitoring network by principal component analysis. *Ground Water*, 39(2), 181–191.
- Gonçalves, C., Esteves da Silva, J. C. G., & Alpendurada, M. F. (2006). Chemometric interpretation of pesticide occurrence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal. *Analytical Chimica Acta*, 560, 164–171.
- Gonçalves, C. M., Esteves da Silva, J. C. G., & Alpendurada, M. F. (2007). Evaluation of the pesticide contamination of groundwater sampled over two years from a vulnerable zone in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6227–6235.
- Kundu, M. C., Mandal, B., & Hazra, G. C. (2009). Nitrate and fluoride contamination in groundwater of an intensively managed agroecosystem: A functional relationship. *Science of the Total Environment*, 407, 2771–2782.
- Mansilha, C., Melo, A., Rebelo, H., Heitor, A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., et al. (2010). Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *Journal of Chromatography A*, 1217(43), 6681–6691.
- Pinto, E., Petisca, C., Amaro, L. F., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2010). Influence of different extraction conditions and sample pretreatments on quantification of nitrate and nitrite in spinach and lettuce. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33, 1–12.
- Portaria nº 556/2003. Approves the action program for the vulnerable zone nº.1, constituted by the free aquifer between Esposende and Vila do Conde. DR 159 Série I-B 2003.
- Russak, A., & Sivan, O. (2010). Hydrogeochemical tool to identify salinization or freshening of coastal aquifers determined from combined field work, experiments, and modeling. *Environmental Science and Technology*, 44, 4096–4102.
- Silva, E., Batista, S., Viana, P., Antunes, P., Serdio, L., Cardoso, A. T., et al. (2006). Pesticides and nitrates in groundwater from oriculture areas of the “Baixo Sado” region (Portugal). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 86, 955–972.
- Simeonov, V., Stratis, J. A., Samara, C., Zachariadis, G., Voutsas, D., Anthemidis, A., et al. (2003). Assessment of the surface water quality in Northern Greece. *Water Research*, 37, 4119–4124.
- Singh, K. P., Malik, A., & Sinha, S. (2005). Water quality assessment and apportionment of pollution sources of Gomti river (India) using multivariate statistical techniques—a case study. *Analytical Chimica Acta*, 538(2), 355–374.
- Squillace, P. J., Scott, J. C., Moran, M. J., Nolan, B. T., & Kolpin, D. W. (2002). VOCs, pesticides, nitrate, and their mixtures in groundwater used for drinking water in the United States. *Environmental Science and Technology*, 36, 1923–1930.
- Szymanska-Pulikowska, A. (2008). Sodium and potassium in the groundwater in areas near the Maslice municipal refuse dump in Wrocław. *Journal Elementology*, 13, 665–673.
- UNEP. (2005). *United Nations Environment Programme. Ridding the world of POPs: A guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Switzerland: Secretariat of the Stockholm Convention.
- Wunderlin, D. A., Díaz, M. P., Amé, M. V., Pesce, S. F., Hued, A. C., & Bistoni, M. L. A. (2001). Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia river basin (Córdoba-Argentina). *Water Research*, 35(1), 2881–2894.

Capítulo 7

**Groundwater from Infiltration Galleries Used for
Small Public Water Supply Systems:
Contamination with Pesticides and Endocrine
Disruptors**

Bull Environ Contam Toxicol (2011) 87:312–318
DOI 10.1007/s00128-011-0337-5

Groundwater from Infiltration Galleries Used for Small Public Water Supply Systems: Contamination with Pesticides and Endocrine Disruptors

C. Mansilha · A. Melo · I. M. P. L. V. O. Ferreira ·
O. Pinho · V. Domingues · C. Pinho ·
P. Gameiro

Received: 7 March 2011 / Accepted: 2 June 2011 / Published online: 17 June 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Infiltration galleries are among the oldest known means used for small public water fountains. Owing to its ancestral origin they are usually associated with high quality water. Thirty-one compounds, including pesticides and estrogens from different chemical families, were analysed in waters from infiltration galleries collected in Alto Douro Demarcated Wine region (North of Portugal). A total of twelve compounds were detected in the water samples. Nine of these compounds are described as presenting evidence or potential evidence of interfering with the hormone system of humans and wildlife. Although concentrations of the target analytes were relatively low, many of them below their limit of quantification, four compounds were above quantification limit and two of them even above the legal limit of 0.1 µg/L: dimethoate (30.38 ng/L), folpet (64.35 ng/L), terbutylazine-desethyl

(22.28 to 292.36 ng/L) and terbutylazine (22.49 to 369.33 ng/L).

Keywords Infiltration galleries · Pesticides · Endocrine disruptors · Groundwater · GC-MS

Infiltration galleries are permeable, horizontal or inclined conduits, into which water can infiltrate from an overlying or adjacent source, characterized by providing a continuous source of water supply that is diverted to the point of interest by gravity through channels/pipelines (Kresic 2007). They are among the oldest known means utilized for small public water supply systems in small villages in the North of Portugal, namely in the Alto Douro Demarcated Wine region.

Routine microbiological and chemical analysis of water supplies from infiltration galleries are regularly applied only when no other water supply is available in the region. Concerning the chemical quality of the water produced by a gallery it is dependent upon the chemical quality of the groundwater present locally, and the chemical quality of the surface source from which infiltration is received. Nowadays there are thousands of anthropogenic compounds mixed in our environment whose possible mechanisms of toxicity, endocrine disruption and physiological outcomes have converted this subject in an emerging study field (Díaz et al. 2009). Owing to ancestral origin of infiltration galleries, inhabitants of these small villages, like many others around the world, associate this type of water with high purity water. However, no studies were found about quantification of pesticides and endocrine disruptor compounds (EDCs) in these waters collected in a region of intense agricultural activity dedicated to viniculture.

C. Mansilha (✉)
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal
e-mail: catarina.mansilha@insa.min-saude.pt

A. Melo · I. M. P. L. V. O. Ferreira · O. Pinho
Requimte, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,
Porto, Portugal

O. Pinho
Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação,
Universidade do Porto, Porto, Portugal

V. Domingues
Requimte, Instituto Superior de Engenharia do Porto,
Porto, Portugal

C. Pinho · P. Gameiro
Requimte, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto,
Porto, Portugal

C. Mansilha
Requimte, Universidade do Porto, Porto, Portugal

The presence of pesticides in waters for human consumption is regulated by national and international rules that establish the maximum concentration of each pesticide at 0.1 µg/L and the total amount of pesticides at 0.5 µg/L in drinking water. For some organochlorines, as aldrin or dieldrin, the maximum individual concentration is even lower 0.03 µg/L (Mansilha et al. 2010).

EDCs, or potential endocrine disruptors include not only pesticides, but other compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons, some heavy metals and steroid hormones (e.g., estrogens) (Birkett and Lester 2003). Concerning the estrogens, there are no parametric values, however, because their estrogenic potency is often several orders of magnitude higher than that of the pesticides, their significantly lower environmental concentrations and relative resistance to biodegradation might, in fact, have a greater environmental impact (Gomes et al. 2003; Sumpter 2005). So, there is concern about the presence of estrogens in drinking water even at nanogram concentrations that may be enough to present a health impact (Stahlschmidt-Allner et al. 1997).

The goal of this work was the evaluation of water quality in small public water fountains of infiltration galleries, located in small villages in the North of Portugal. Trace analysis of thirty-one compounds, including estrogens and pesticides from different chemical families, some of them with endocrine disrupting properties were performed by gas chromatography–tandem mass spectrometry.

Materials and Methods

Reference standards of estrogens (Estrone, Estradiol) and pesticides from different chemical families (EPTC, Folpet, Phosmet, 2,4-D, Atrazine-desethyl, Terbutylazine-desethyl, Iprodione, Dimethoate, Atrazine, Atrazine-d₅, Cyromazine, Terbutylazine, Pirimicarb, Alachlor, Metalaxyl, Linuron, S-Metolachlor, Aldrin, Thiamethoxam, Pendimetaline, Cyprodinil, Tolyfluanid, Fludioxonil, Dieldrin, Endrin, o,p'-DDT, Fenehexamid, Acetamiprid, Methoxychlor, Azoxystrobin) with purity > 98% were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents were organic trace analysis grade SupraSolv from Merk. Ultra-pure water (0.054 µS/cm) was obtained by using a Milli-Q system from Millipore (Milford, MA, USA).

Individual stock standard solutions of 250 mg/L were prepared in methanol by exact weighing of the high-purity substances and accurate dilution. A mixture was then prepared, also in methanol, containing 1.5 mg/L of each individual compound. Calibration standard solutions, with concentration levels ranging from 15 µg/L to 360 µg/L were prepared by appropriate dilution of the 1.5 mg/L

mixture with methanol in 10 mL volumetric flasks. Stock standard solutions were stored in amber glass-stoppered flasks at 4°C.

Matrix-standard calibration solutions (residue-free matrix spiked with standards) with concentration levels ranging from 15 to 360 µg/L were prepared by spiking 500 mL of water with different volumes of the 1.5 mg/L mixture just before extraction.

Nine water samples were collected in small villages in the North of Portugal near Douro River (Fig. 1, Table 1), in July 2009. Prior to extraction, 500 mL volume of water samples were filtered through glass fiber filters (Whatman, GF/F 47 mm, Maidstone, England) and spiked with the internal standard (atrazine-d₅ or 2-Chloro-4-pentadeuteroethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) at 240 µg/L. Blank samples were prepared by adding the internal standard to residue-free water matrix.

Solid phase extraction was conducted in LiChrolut EN RP-18 SPE cartridges (100 mg/200 mg, 6 mL) from Merck (Darmstadt, Germany) using the following conditions: (a) conditioning step, by the sequential addition of 7 mL of ethyl acetate, 7 mL of methanol and 7 mL of Milli-Q water at a flow rate of 1 mL/min; (b) loading step, by passing 500 mL of the sample through the cartridge at a flow of 5 mL/min; (c) washing step, by rinsing the cartridge with 5 mL water and dried by vacuum pressure during approximately 60 min; and (d) elution performed with 2 × 2.5 mL of methanol and 2 × 2.5 mL acetonitrile, at a flow of 1 mL/min. After elution, the extracts were evaporated to dryness in a rotative evaporator (Buchi/Brinkman Rotavapor RE-111 & Water Bath B-461) and then re-suspended until a final volume of 500 µL in methanol and directly analyzed by GC/MS.

Chromatographic analyses were carried out in a Shimadzu GCMS-QP2010 Gas Chromatograph Mass Spectrometer equipped with a fused-silica capillary column coated with 5% diphenylmethylsiloxane, VF-5 MS (30 × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness) from Varian. High-purity helium (99.9999%) at a constant flow rate of 1.5 mL/min was used as the carrier gas.

For injection an AOC-5000 injector was used. Injections (1 µL) were made in the splitless mode with a 1.0 min purge-off time and injector temperature set at 275°C.

Samples were analyzed using the following oven temperature programme: initial temperature 60°C (held for 2 min), increased by 10°C/min to 200°C (held for 1 min), increased again by 10°C/min to 275°C and held at this temperature for 10 min.

GC was directly interfaced to a Shimadzu QP 2010 quadrupole mass spectrometer with an interface temperature of 250°C, and ionization by 70 eV electron impact. The transfer line was set at 275°C and the source at 200°C.

Fig. 1 Schematic localization of 9 infiltration galleries (fountains for public supply) sampled in the 'Alto Douro Demarcated Wine region' (marked on dark grey)

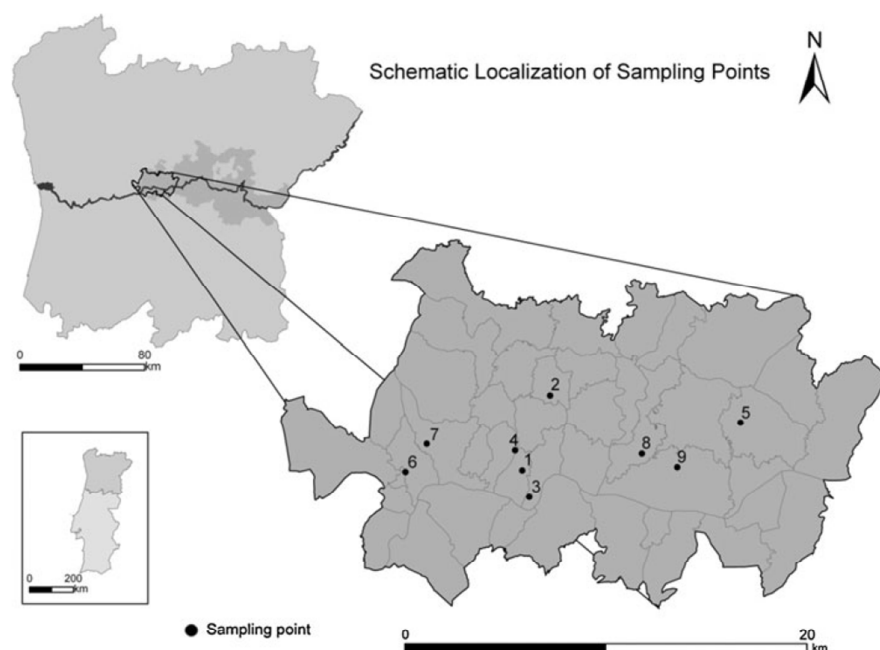


Table 1 Infiltration galleries (fountains for public supply) sampling location data

Sample code	Coordinates: latitude/longitude	Area name
1	41°09'49.40"N 7°49'06.95"W	Fontelas
2	41°11'06.95"N 7°48'27.84"W	Loureiro
3	41°09'06.40"N 7°48'51.04"W	Cederna
4	41°10'21.52"N 7°49'48.52"W	Oliveira
5	41°11'04.67"N 7°41'21.07"W	Galfura
6	41°09'47.84"N 7°53'15.79"W	Mesão Frio
7	41°10'32.70"N 7°52'29.73"W	Vila Marim
8	41°10'15.64"N 7°44'51.27"W	Vilarinho
9	41°09'53.98"N 7°43'36.18"W	Canelas

Positive fragment ions (m/z —ions mass/charge ratio) were analyzed over 43–500 m/z mass range in SCAN mode and in selected-ion monitoring (SIM) mode.

The chromatographic method gives, as usual, response to several substances simultaneously, including analytes and interferences; thus, it is important to assess specificity/selectivity. This can be done by comparison of mass spectra of chromatographic peaks with referenced standards. As acceptance criteria the responses of interfering peaks at the retention time of the analyte should be less than 30% of the response of the limit of quantification standards (SANCO 2009).

One of the most common definition of limit of quantification (LOQ) assumed to be the lowest amount of an analyte in a sample that can be quantified with acceptable precision and accuracy whereas the limit of detection (LOD) is the lowest concentration of an analyte

that can be reliably differentiated from the background noise but not necessarily quantified as an exact value (ICH 2005). Both can be calculated based on the calibration curve parameters (ICH 2005; Miller and Miller 2005; NCCLS 2004).

Measurements by mass spectrometry coupled with chromatographic separation technique provided data on retention times, ions mass/charge ratio, abundance and ionization profile as described in Table 2.

The chromatographic peaks of the analytes must have a signal/noise ratio (S/N) greater than 3:1 and a shape and retention time similar to those obtained from calibration standards within a specified range of variations with $\pm 0.5\%$ tolerance for GC (SANCO 2009). When the identification is carried out in SIM mode, ions must meet the calibration standards measured under the same conditions. Intensity ratios for principal ions should be within the limit of tolerance of 25%. A minimum of four ions must be present with a relative intensity $\geq 10\%$ of the base peak and the molecular ion should be included, if present, in the reference spectrum with a relative intensity also above 10%.

Several spectral libraries were used (NIST, PEST, PESTEL_3, PESTNCI3, WILEY229, SZTERP). Additionally, a library was created for comparison purposes with mass spectra of the pure standards used in this work.

Results and Discussion

Trace analysis of thirty-one compounds was performed by GC/MS in nine samples of water from small public

Table 2 Method validation data

EDC/pesticides	$b_w \pm t_{(n-2)} \cdot S(b)_w$ (95%)	$a_w \pm t_{(n-2)} \cdot S(a)_w$ (95%)	$S_{(y/x)_w}$	r_w	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
1 EPTC	143.57 ± 4.16	−781.11 ± 796.79	437.09	0.9965	9.10	30.40
2 Folpet	73.77 ± 5.03	1502.26 ± 999.45	460.83	0.9938	18.70	62.50
3 Phosmet	215.61 ± 10.88	257.38 ± 2161.83	996.80	0.9963	13.90	46.20
4 2,4-D	11.38 ± 0.24	−16.41 ± 45.19	24.79	0.996	6.50	21.80
5 Atrazine-desethyl	155.17 ± 2.69	−884.61 ± 516.10	283.12	0.9987	5.50	18.20
6 Terbutylazine-desethyl	204.23 ± 3.68	−336.09 ± 705.44	386.98	0.9995	5.70	18.90
7 Iprodione	40.11 ± 0.87	449.60 ± 173.41	79.96	0.9994	6.00	19.90
8 Dimethoate	154.23 ± 1.27	−1113.67 ± 242.28	132.91	0.9992	2.60	8.60
9 Atrazine	161.08 ± 3.09	−602.15 ± 592.67	325.12	0.996	6.10	20.20
10 Cyromazine	22.80 ± 2.08	−210.07 ± 413.60	218.60	0.9966	28.80	95.90
11 Terbutylazine	207.47 ± 1.05	−245.39 ± 200.61	110.05	0.9999	1.60	5.30
12 Pirimicarb	640.96 ± 11.40	−779.31 ± 2265.43	1044.56	0.9984	4.90	16.30
13 Alachlor	189.68 ± 2.02	1276.34 ± 387.33	212.48	0.9977	3.40	11.20
14 Metalaxyl	142.94 ± 9.19	−539.94 ± 1827.37	842.58	0.9968	17.70	58.90
15 Linuron	184.07 ± 3.19	−125.53 ± 611.02	335.19	0.9983	5.50	18.20
16 S-Metolachlor	178.01 ± 2.60	−834.52 ± 497.18	272.74	0.9984	4.60	15.30
17 Aldrin	19.91 ± 1.15	−114.13 ± 219.90	120.63	0.9988	18.20	60.60
18 Thiamethoxam	96.61 ± 1.97	−159.94 ± 391.89	180.69	0.9977	5.60	18.70
19 Pendimethalin	34.06 ± 1.01	236.39 ± 193.19	105.98	0.9982	9.30	31.10
20 Cyprodinil	886.28 ± 12.07	−2042.23 ± 2398.71	1106.02	0.9988	3.70	12.50
21 Tolyfluanid	110.48 ± 4.06	924.17 ± 806.44	371.84	0.9976	10.10	33.70
22 Fludioxonil	310.56 ± 4.90	−747.35 ± 974.07	449.13	0.9994	4.30	14.50
23 Dieldrin	133.93 ± 1.81	490.24 ± 345.93	189.77	0.9997	4.30	14.20
24 Endrin	23.66 ± 1.27	782.46 ± 242.52	133.04	0.9995	16.90	56.30
25 o,p'-DDT	64.67 ± 0.98	−135.30 ± 188.40	103.35	0.9997	4.80	16.00
26 Fenehexamid	30.22 ± 1.42	74.06 ± 282.55	130.28	0.9953	12.90	43.10
27 Acetamiprid	53.47 ± 3.13	−357.54 ± 621.68	286.65	0.9976	16.10	53.60
28 Methoxychlor	153.73 ± 4.71	216.13 ± 901.08	494.30	0.998	9.60	32.20
29 Estrone	90.79 ± 1.88	−542.32 ± 359.99	197.48	0.9982	6.50	21.80
30 Estradiol	76.11 ± 1.21	−553.75 ± 230.97	126.70	0.9988	5.00	16.60
31 Azoxystrobin	56.07 ± 3.54	−370.69 ± 704.02	324.62	0.9972	17.40	57.90

Calibration parameters and related uncertainties

b_w —weighted slope, a_w —weighted intercept, r_w —weighted correlation coefficient; $S(b)_w$ and $S(a)_w$ —standard deviations of the weighted slope and weighted intercept, $S(y/x)_w$ —standard deviation of y-residuals of weighted regression line. LOD—limit of detection; LOQ—limit of quantification

fountains of infiltration galleries. The methodology was previously validated by us according mainly the International Conference on Harmonisation recommendations (Mansilha et al. 2010) using a weighted least squares linear regression procedure as heteroscedasticity has been verified for the target analytes. Calibration parameters are shown in Table 2.

A total of twelve compounds (folpet, 2,4-D, atrazine-desethyl, terbutylazine-desethyl, dimethoate, terbutylazine, dieldrin, endrin, o,p'-DDT, methoxychlor, estrone, estradiol) were detected in the nine water samples analysed. The remaining nineteen compounds screened by the GC-MS method were not detected in any sample. The concentrations of the target analytes were relatively low, many of them being frequently below their LOQ (2,4-D, atrazine-desethyl,

dieldrin, endrin, o,p'-DDT, methoxychlor, estrone, estradiol). Only four compounds were above the LOQ (Table 3).

The calculation of analytes concentration in samples has an error associated with concentration estimation. Slope, intercept and the instrumental signal are subject to random errors that should not be ignored. Thus, this determination is complex but important to guarantee the reliability of results. Associated Errors Measurement (AEM) ranged between 0.57 and 6.78 ng/L, corresponding to a value around 2% of the concentration levels. It was lower than 10% in all measurements (Table 3).

In addition, deuterated-atrazine was used as a quality control internal standard, so-called procedural or instrument internal standard, for process evaluation through recovery studies, being added in a constant amount to samples and

Table 3 Results obtained in the analysis of estrogens and pesticides from different chemical families (some of them with endocrine disrupting properties) in waters from infiltration galleries used for small public water supply systems in small villages in the North of Portugal

EDCs/ pesticides	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		Sample 7		Sample 8		Sample 9	
	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)	Conc. (ng/L)	AEM (ng/L)
Folpet	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	64.35	± 6.78	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
2,4-D	12.43	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	6.54	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Atrazine- desethyl	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	9.25	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Terbutylazin- desethyl	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	292.36	± 4.70	n.d.	—	n.d.	—	22.28	± 2.05	108.77	± 2.44	n.d.	—
Dimethoate	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	30.84	± 1.97	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Terbutylazin	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	369.33	± 2.21	n.d.	—	n.d.	—	3.78	*	22.49	± 0.57	n.d.	—
Dieldrin	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	11.96	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Endrin	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	*	24.15	*
o,p'-DDT	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	7.95	*	n.d.	—	n.d.	—	6.47	*	n.d.	—	n.d.	—
Methoxychlor	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	11.56	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Estrone	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	18.30	*	7.44	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
Estradiol	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	8.10	*	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—

AEM—Associated error measurement applying de equation $S_{hw} = \frac{S_{U/3hw}}{b} \sqrt{\frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_{hw})^2}{b^2 \sum_i (w_i x_i^2 - n \bar{x}_{hw}^2)}}$, *AEM cannot be estimated when measurement is below LOQ

calibration standards prior to extraction. The mean recovery and standard deviation was $90.74 \pm 12.08\%$ with a coefficient of variation (CV) of 13.31%. The control limits established are set between 70 and 120%, with $CV \leq 20\%$ according to SANCO (2009).

None of the compounds under study were detected in samples 2 and 3. One single pesticide was detected in three other samples, but each one presented a different compound (2,4-D, dimethoate and endrin, respectively in samples 1, 6 and 9). However, only dimethoate was above the limit of quantification. Estrone and estradiol and two pesticides (2,4-D, atrazine-desethyl) were detected in sample 5, but below quantification limits. Samples 7 and 8 presented three pesticides, two of them were common in these two samples, namely, terbuthylazine-desethyl and terbuthylazine. DDT was detected below quantification limit in sample 7 and endrin was detected in sample 8. The most contaminated sample was sample 4, with seven compounds including EDCs and other pesticides: folpet, terbuthylazine-desethyl and terbuthylazine were quantified and dieldrin, o,p'-DDT, methoxychlor and estrone were below quantification limit.

The maximum concentration of each pesticide is 0.1 µg/L with a total amount of pesticides of 0.5 µg/L for drinking water. Sample 4 exceed the parametric values for terbuthylazine-desethyl and terbuthylazine (0.292 and 0.369 µg/L, respectively) and for the total amount of pesticides (0.661 µg/L). Sample 8 exceed the parametric value for terbuthylazine-desethyl (0.108 µg/L). All other samples are in agreement with legislation.

Nine compounds that presented evidence or potential evidence of being EDCs (estrone, estradiol, o,p'-DDT, methoxychlor, dieldrin, endrin, 2,4-D, dimethoate, folpet) were detected in samples under study (the first four were classified as Cat 1, the other four were classified as Cat 2 by EU, the last compound was highlighted by EPA, COM 1999, SEC 2007).

Among of the most important group of chemicals considered as EDCs are steroids (Zarzycki et al. 2009). Residual levels of estrone and estradiol were detected in two water samples.

Folpet is a potential EDC (EPA 2004) that has been used in agricultural practices for the past 50 years. Studies performed in vitro have found folpet to induce cell-cycle deregulation (Canal-Raffin et al. 2008). This compound was quantified within the legal limits in one sample. Moreover, some pesticides detected at residual level in the water samples are not allowed in European agriculture, however, its analysis is justified because they are very persistent and present a long half-life: DDT, methoxychlor, dieldrin and endrin. Despite the fact that the use of these compounds ceased many years ago, they are very persistent in the environment and are still present in nature from

former applications (Tiemann 2008, Buser et al. 2009; Matsumoto et al. 2009).

The general idea that water from infiltration galleries present always high quality was not confirmed. The sampling region chosen for this study was located in a small area (around 100 km²). However, the qualitative and quantitative pesticide profile of water samples analysed and, therefore, its quality was clearly different. Target EDCs and other pesticides were found in seven of the nine samples and the most frequent was terbuthylazine and its metabolite terbuthylazine-desethyl that exceeded, in two samples, the 0.1 µg/L EU limit for individual pesticides. The intensive character of the local agriculture contributed to the diversity of pesticides that were detected and quantified. Winegrowers use different pesticides to control the diverse pest that affect the wine.

Acknowledgments One of the authors (A. Melo) wishes to thank Fundação Ciência Tecnologia the grant SFRH/BD/41764/2007.

References

- Birkett JW, Lester JN (2003) Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes. CRC Press LLC Lewis Publishers, Florida
- Buser HR, Müller MD, Buerge IJ, Poiger T (2009) Composition of aldrin, dieldrin, and photodieldrin enantiomers in technical and environmental samples. *J Agric Food Chem* 57:7445–7452
- Canal-Raffin M, l'Azou B, Jorly J, Hurtier A, Cambar J, Brochard P (2008) Cytotoxicity of folpet fungicide on human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 249:160–166
- COM (1999) 706, Commission of the European Communities (1999). Community strategy for endocrine disruptors a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament. Brussels, Belgium
- Díaz G, Ortiz R, Schettino B, Vega S, Gutiérrez R (2009) Organochlorine pesticides residues in bottled drinking water. *Bull Environ Contam Toxicol* 82:701–704
- Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN (2003) Determination of endocrine disruptors in sewage treatment and receiving waters. *Trend Anal Chem* 22:697–707
- ICH, International Conference on Harmonisation (2005) Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)
- Kresic N (2007) Hydrogeology and groundwater modeling, 2nd edn. CRC Press-Taylor & Francis Group, Florida
- Mansilha C, Melo A, Rebelo H, Heitor A, Ferreira IMPLVO, Pinho O, Domingues V, Pinho C, Gameiro P (2010) Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *J Chromatogr A* 1217:6681–6691
- Matsumoto E, Kawanaka Y, Yun SJ, Oyaizu H (2009) Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Appl Microbiol Biot* 84:205–216
- Miller JN, Miller JC (2005) Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5th edn. Pearson Education Limited, England

- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Approved Guideline, EP17-A. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation
- SANCO/10684/2009 of European Union (2009) Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed
- SEC (2007) 1635. Commission of the European Communities (2007). Commission staff working document on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters—a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brussels, Belgium
- Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Rombke J, Knacker T (1997) Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environ Sci Pollut R* 4:155–162
- Sumpter JP (2005) Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydroch Hydrob* 33:9–16
- Tiemann U (2008) In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reprod Toxicol* 25:316–326
- Zarzycki PK, Włodarczyk E, Baran M (2009) Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. I. Optimization of separation protocol. *J Chromatogr A* 1216:7602–7611

PARTE III

Capítulo 8

Otimização e validação de metodologias analíticas multirresíduo para análise de níveis vestigiais de pesticidas em água e vegetais

Capítulo 8. Otimização e validação de metodologias analíticas multirresíduo para análise de níveis vestigiais de pesticidas em água e vegetais

O desenvolvimento de um novo método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, requer um processo prévio de validação que avalie a sua eficiência na rotina do laboratório. Só assim se poderão obter dados analíticos inequívocos que sejam aceites internacionalmente. Um método analítico é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (1). O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Os critérios de validação enfatizam a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação. No âmbito desta dissertação foram implementados e validados diferentes métodos de extração/purificação utilizando baixo consumo de reagentes, tais como SPE, SPME, QuEChERS e DLLME acoplados a técnicas cromatográficas, nomeadamente, GC/MS e HPLC/DAD.

8.1. Análise de resíduos de pesticidas em água por SPE-GC/MS

No Capítulo 2 foi desenvolvida uma metodologia multirresíduo, baseada na extração por SPE e posterior quantificação por GC/MS, para a análise de pesticidas de várias famílias químicas (alguns com propriedades disruptoras endócrinas) em águas subterrâneas. Os compostos de interesse foram selecionados de acordo com: i) produtos fitofarmacêuticos mais utilizados na área agrícola próxima dos locais estudados e ii) compostos com interesse devido à sua toxicidade ou persistência no ambiente.

No início da década de 90, os pesticidas apolares e halogenados eram os compostos mais estudados (2). Posteriormente, verificou-se que estes compostos acarretavam grandes problemas para o ambiente, e consequentemente, para o homem, por isso, foram substituídos por compostos de nova geração considerados mais inofensivos para o ambiente. A descoberta de atividade disruptora endócrina em alguns destes compostos causando efeitos ecotoxicológicos com repercussões na saúde e no ambiente alertou para uma nova problemática nesta área (3, 4).

O método foi validado para 9 herbicidas (*EPTC*, *atrazine-desethyl*, *terbuthylazine-desethyl*, *terbuthylazine*, *linuron*, *alachlor*, *S-metolachlor*, *pendimethaline*, *2,4-D*, *atrazine*), 11 inseticidas (*phosmet*, *dimethoate*, *aldrin*, *dieltrin*, *endrin*, *o.p-DDT*, *methoxychlor*, *acetamiprid*, *pirimicarb*, *thiamethoxam*, *cyromazine*) e 8 fungicidas (*metalaxyl*, *cyprodinil*, *tolyfluanid*, *fludioxonil*, *fenhexamid*, *azoxystrobin*, *folpet*, *iprodione*). Para além destes, o método foi também validado para 2 estrogénios (*estrone*, *estradiol*).

O critério de seleção dos pesticidas analisados baseou-se nas listas de poluentes orgânicos persistentes da convenção de Estocolmo (5), nas substâncias prioritárias que constam da Decisão nº 2455/2001/EC (6), na lista de disruptores endócrinos da agência de proteção do ambiente dos EUA (7), assim como, na legislação portuguesa, nomeadamente no Decreto-Lei 506/99, no Decreto-Lei 306/2007 e na Entidade Reguladora dos Serviços de Água e de Resíduos (8), de forma a estar de acordo com os pressupostos da legislação portuguesa e da legislação internacional.

No caso da UE, a legislação estabelece como valores paramétricos de pesticidas na água para consumo humano 0,1 µg/L para um único pesticida, e 0,5 µg/L para o somatório de todos os resíduos de pesticidas encontrados, através da Diretiva 98/83/CE (9). A necessidade de detetar pesticidas em níveis muito baixos implica uma extração e concentração da amostra de forma a obter sensibilidade e limites de deteção adequados. Na metodologia validada no Capítulo 2 recorreu-se a uma técnica de SPE, pois apresenta, comparativamente à LLE, uma boa eficiência de extração, é fácil de utilizar, tem menor consumo de solventes e melhor seletividade. Comparada com os outros métodos de extração, a técnica de SPE é o método mais utilizado e convencionalmente aceite como forma de extração de resíduos de pesticidas em águas (10-12). Esta técnica de extração acoplada a GC/MS permitiu a identificação e quantificação dos compostos de interesse em concentrações inferiores aos limites legais estabelecidos. Utilizando um volume de 500 ml de água foi possível detetar concentrações inferiores a ppb. O pH das amostras foi ajustado a 3,5 para garantir a eficiência da extração.

Durante a determinação por GC/MS foram observados efeitos de matriz, tais como, intensificação ou supressão do sinal, observados em soluções padrão que sofreram o mesmo tratamento das amostras, por comparação com soluções padrão preparadas em metanol e injetadas diretamente. O efeito de matriz foi ultrapassado utilizando soluções padrão preparadas nas mesmas condições aplicadas às amostras, e utilizando o procedimento recomendado por laboratórios governamentais nos Estados Unidos e orientações Europeias (13).

Os parâmetros de validação do método de SPE-GC/MS envolveram a avaliação da especificidade/seletividade, função da resposta (calibração), linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez, de acordo com as orientações emanadas da International Conference on Harmonization (ICH) (14-16). Para a elaboração destes documentos contribuíram autoridades reguladoras internacionais e organismos internacionais, nomeadamente, a União Europeia (15), a *Food and Drug Administration* (FDA) (17), o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), anteriormente designado NCCLS (1,

18), o grupo EURACHEM (19, 20), a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (21), a *International Organization for Standardization* (ISO) (22-24), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (25), e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (26).

Quanto aos termos de validação, o termo especificidade/seletividade define a capacidade do método em detetar os compostos de interesse na presença de outros componentes da matriz. A especificidade/seletividade do método de SPE-GC/MS foi avaliada testando amostras de brancos (água ultrapura) utilizando o método de extração e as condições cromatográficas propostas e amostras aquosas contendo padrões em concentrações próximas do LD. A ICH (16), assim como, a CE (15) e a FDA (17) sugerem que esta é a forma mais simples de comprovar que não existem interferentes com o mesmo tempo de retenção dos compostos em estudo. A seletividade também foi avaliada por comparação do espectro de massa dos compostos em estudo com o espectro de massa de diversas bibliotecas (NIST, Wiley, PEST e PESTAI) para uma identificação inequívoca dos compostos alvo.

O gráfico analítico (função da resposta) apresenta os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração das soluções padrão usadas na calibração. Na determinação de resíduos de pesticidas, normalmente é utilizada uma ampla gama de concentrações para a calibração, sendo necessário escolher um método de calibração apropriado para uma quantificação fiável. Deste modo, para a elaboração da curva de calibração é necessário verificar se todos os pressupostos estão cumpridos. Um dos pressupostos mais importantes é a homocedasticidade das variâncias entre cada ponto de leitura. O não cumprimento deste pressuposto acarreta um aumento dos erros relativos das medições em concentrações mais baixas (27). Quando este facto ocorre, normalmente leva a uma sobrestimação destas concentrações. Uma forma de contornar este problema é através da utilização de um modelo de regressão linear ponderada (28). Com a utilização deste modelo verificou-se a diminuição dos erros relativos no extremo inferior da curva de calibração e, conseqüentemente, uma maior exatidão das medições nesta gama. Embora a regressão linear ponderada seja mais complexa que a regressão linear simples, envolvendo operações matemáticas e testes estatísticos adicionais, estes factos não devem demover a sua utilização, devido à obtenção de resultados mais realistas e com limites de deteção mais baixos.

O LD, definido como a concentração mais baixa do composto a analisar que pode ser diferenciada com rigor do ruído de fundo, mas não necessariamente quantificada como

um valor exato (14), foi calculado com base nos parâmetros da curva de calibração (14, 18, 29), pela intercepção ou a partir do desvio padrão residual obtido.

O LQ, definido como a concentração mais baixa de composto a analisar que pode ser quantificado com uma precisão e exatidão aceitável, também foi calculado com base nos parâmetros da curva de calibração (14, 18, 29).

Nas condições experimentais otimizadas os LDs variaram entre 1,60-28,80 ng/L os LQs foram também na gama ng/L com valores inferiores a 0,05 µg/L para 77,4% dos compostos e, em todos os casos, inferiores ao limite imposto pela legislação (0,1 µg/L) (9).

A precisão do método, expressa como o coeficiente de variação (CV%) de uma série de medições, foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia. No que respeita à repetibilidade (9 análises realizadas no mesmo dia, 3 níveis de concentração, 3 replicados) o CV médio foi 6,93%. Na precisão intermédia (3 análises independentes de SPE-GC/MS e 9 determinações, correspondendo a 3 níveis de concentração, 1 determinação por dia) o CV médio foi 11,47%. Em geral, os resultados obtidos estão concordantes com os limites estabelecidos pela FDA e ANVISA (precisão inferior a 15% excepto no LQ que pode ser 20%) (17, 25) e pela ICLS (18) e SANCO (15) que define um CV inferior a 20% para os 3 níveis de concentração.

A ICH define a exatidão como o grau de concordância entre o valor obtido num teste e o valor de referência aceite como verdadeiro (30). Esta definição está também de acordo com a *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC International) e a *International Organization for Standardization* (ISO). O termo exatidão reflete com precisão a combinação de erros sistemáticos (*bias*) e erros aleatórios (precisão) (22-24).

A exatidão, para cada nível de concentração, foi avaliada comparando a concentração média dos resultados obtidos pela equação da reta de regressão da curva de calibração e a concentração real nas amostras. As oscilações variaram entre -16,68% e 13,64% para os testes realizados em dias diferentes e -15,91% e 17,76% para os testes realizados no mesmo dia. Em geral, os compostos em estudo apresentaram valores dentro dos critérios de aceitação propostos $\pm 15\%$ do valor real, exceto no LQ em que é aceitável $\pm 20\%$.

A FDA (17), ANVISA (25) e INMETRO (26) sugerem que a avaliação da exatidão se realize também através de ensaios de recuperação e avaliação da eficiência de extração. O cálculo das recuperações foi realizado em 3 níveis de concentração, 15, 90, e 360 ppb, tal como recomendado pela ICH (30). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o valor teórico e as concentrações obtidas experimentalmente ($p > 0.05$) aplicando o *test-t de Student* para um intervalo de confiança de 95%. O valor médio

de recuperação foi 101,01% e o desvio padrão da recuperação média para cada nível de fortificação foi 0,96%. De acordo com a SANCO as recuperações devem estar no intervalo de 70 % a 120% (15).

Diferentes organismos, tais como, a UE ou a EUROCHEM têm tentado harmonizar os parâmetros de validação analítica de forma a aumentar a confiança nos dados analíticos obtidos num determinado método, dada a importância e impacto económico da determinação dos LMR de pesticidas (31). Uma das formas de aumentar a confiança dos dados analíticos é através da incerteza associada à medição analítica, que descreve o intervalo em torno de um resultado dentro do qual o verdadeiro valor pode ser esperado, com um certo nível de probabilidade. Esta incerteza geralmente tem em consideração todas as fontes de possíveis erros. Os resultados obtidos sugerem uma grande influência da concentração e da natureza dos compostos.

O estudo da robustez do método proposto avaliou a sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas, variações nos parâmetros do método e forneceu uma indicação de sua fiabilidade durante o uso normal (ICH). A robustez é um dos parâmetros discutidos nas recomendações da ICH (16), da UE (31) e da CLSI (1, 18), sendo um parâmetro importante quando o método é aplicado por longos períodos de tempo e / ou em laboratórios diferentes. Este parâmetro foi avaliado na fase final da validação, dado que o método ia ser usado ao longo de um ano na monitorização das concentrações de pesticidas, na água de poços e furos, proveniente de uma zona de horticultura intensiva. Investigaram-se as condições suscetíveis de exigir controlo estrito quando aplicado na rotina. No entanto, não se verificaram discrepâncias nos dados cromatográficos obtidos com colunas de duas marcas diferentes, nem com diferentes lotes de cartuchos de SPE e de solventes.

8.2. Avaliação de pesticidas em alface (*Lactuca sativa*) por SPME-HPLC/DAD

Uma importante via de exposição dos humanos aos resíduos de pesticidas, além da ingestão através da água, é a através da ingestão de alimentos contaminados. Assim, é necessário assegurar que os consumidores não estão expostos a níveis superiores aos limites legislados, e que apenas os pesticidas permitidos estão a ser utilizados em cada género alimentício, na dose adequada de aplicação, e cumprindo o respetivo intervalo de segurança. Nos Capítulos 3, 4 e 5 desta dissertação são apresentados diferentes métodos de extração e deteção dos resíduos de pesticidas em vegetais, sempre com o intuito de otimizar métodos menos agressivos para o ambiente, comparativamente com as técnicas tradicionais.

No Capítulo 3 foi otimizada uma técnica de microextração em fase sólida (SPME) com detecção por HPLC/DAD para a análise de 8 fungicidas (*azoxystrobin*, *cyprodinil*, *fenhexamid*, *fludioxonil*, *folpet*, *iprodione*, *metalaxyl*, *tolyfluanid*) e 2 inseticidas (*acetamiprid*, *pirimicarb*) vulgarmente usados na alface. A separação cromatográfica dos pesticidas efetuou-se com eluição por gradiente com uma mistura de dois eluentes (ácido trifluoroacético a 0,1% em água e metanol) que permitiu separar os 10 compostos em estudo, bem como o padrão interno (*phosmet*, um pesticida que não é usado na alface) em menos de 25 minutos.

Desde a criação da técnica de SPME, por Pawliszyn (32), que esta ganhou muita popularidade devido à simplicidade de utilização, baixo consumo de solventes orgânicos, durabilidade, e flexibilidade na análise de uma grande variedade de compostos voláteis ou semivoláteis. É uma técnica muito usual para extração direta de pesticidas em amostras de água. Os frutos e vegetais, sendo amostras sólidas e heterógenas, não permitem a extração direta dos pesticidas, contudo é possível a análise por SPME após prévia extração por solvente (33, 34). Inicialmente verificou-se uma maior hifenização do SPME com a cromatografia gasosa, mas com a recente introdução das interfaces para HPLC passou a ser uma técnica utilizada na análise dos pesticidas também por HPLC (35).

O desenvolvimento de um método de SPME-HPLC requer a seleção de diversas variáveis, nomeadamente, o tipo de fibra, o tempo de extração, o solvente de desorção, o tempo de imersão, o tempo de desorção, a temperatura de extração, o pH da solução da amostra, e a força iónica.

Tradicionalmente, a otimização em química analítica de um sistema multivariado é através da otimização univariada, ou seja, avalia-se a influência de uma variável de cada vez, numa dada resposta experimental. Enquanto um parâmetro é variado, os restantes são mantidos constantes. A desvantagem da otimização univariada reside no facto de não incluir a interação dos efeitos entre as diferentes variáveis ao longo do estudo. Deste modo se existirem interações entre as variáveis é pouco provável encontrar o ponto ótimo. (36). De forma a limitar este problema na otimização dos métodos analíticos, o ideal é recorrer a métodos estatísticos multivariados, sendo a metodologia de superfície de resposta (RSM) a mais relevante e comumente aplicada. Trata-se de uma ferramenta útil porque fornece um modelo estatístico que ajuda a entender as interações entre os parâmetros que estão a ser otimizados.

A RSM é a reunião de técnicas matemáticas e estatísticas para modelar e resolver problemas com base no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que deve descrever o comportamento de um conjunto de dados, com o objetivo de fazer

previsões estatísticas. Pode ser aplicada quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciados por diversas variáveis. O objetivo é o de otimizar simultaneamente os níveis destas variáveis para atingir o melhor desempenho do sistema (36). Neste tipo de otimização, geralmente é utilizado um programa informático, comercialmente disponível, para ajudar no delineamento e análise das diferentes experiências efetuadas. Estes programas informáticos permitem estabelecer critérios de otimização para as diferentes variáveis. O parâmetro utilizado para avaliação da otimização do método analítico é, normalmente, a resposta analítica obtida, no entanto, mais do que uma resposta pode ser adicionada para a otimização.

Os modelos de superfície de resposta podem ser explorados para determinar condições ótimas do método de extração. Nesta exploração dos dados podem ser atribuídos fatores de importância relativa a cada uma das variáveis ou repostas, e que vão de encontro às prioridades pretendidas na otimização. Sendo assim, pode ser atribuído um valor que varia entre 1 (que é o valor desejável) e 0 (que é o valor indesejável) e, finalmente, obter um valor ótimo global que é resultado das melhores condições das diferentes variáveis.

No Capítulo 3 efetuou-se uma cuidadosa otimização de diferentes parâmetros, tais como, a seleção do revestimento da fibra, a agitação, as condições de desorção, o tempo de extração, a quantidade de sal adicionada, e o pH de extração, de forma a melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade do método. Os ensaios para a seleção da fibra SPME foram realizados por imersão direta da fibra em 4,0 mL de solução padrão contendo 1 µg/mL de cada pesticida em acetonitrilo:água (1:9). Os ensaios realizaram-se à temperatura ambiente (22 ± 3 °C) durante 30 min (agitação a 1000 rpm), 30 % m/v de cloreto de sódio. A câmara de desorção da interface SPME-HPLC (60 µL) foi previamente cheia com solução metanol:água (9:1). Foram testadas quatro fibras diferentes, PDMS, PDMS/DVB, PA, CW/TPR, e a que apresentou melhores resultados foi a última, embora não permitisse extrair o composto *acetamiprid*. Posteriormente, outros parâmetros, tais como, o solvente de desorção e o tempo de imersão também foram selecionados por otimização univariada.

O tempo de extração, a quantidade de sal adicionada e o pH de extração foram considerados fatores chave no processo de otimização. Deste modo, o efeito combinado destes 3 parâmetros foi avaliado com recurso a RSM, usando a fibra CW/TPR, desorção com metanol:água (9:1) em 10 minutos e seguindo o desenho experimental obtido por *Central Composite Design* (CCD) que definiu a sequência de 20 experiências que foram realizadas para encontrar o ponto de resposta ótima, que foi depois testado experimentalmente.

A RSM revelou-se uma metodologia muito útil (36), na otimização do método de SPME (37). Permitiu explorar as relações entre as 3 variáveis (o tempo de extração, a adição de sal, e o pH da extração) e o sinal analítico obtido no sistema cromatográfico (38). Na otimização da metodologia de extração foi atribuída uma importância relativa superior aos parâmetros de maximização da resposta analítica e minimização do tempo de extração. O ponto ótimo foi obtido para 30 minutos de tempo de extração, a pH 8 e mantendo a percentagem de NaCl a 17,6%. A resposta obtida experimentalmente estava dentro dos 95% de intervalo de previsão de resposta, indicando concordância com o modelo fornecido pelo *software* de RSM.

Após otimização da extração dos pesticidas realizada com soluções padrão, efetuou-se a validação usando alface biológica, livre de pesticidas, para avaliar o efeito de matriz. Quatro curvas de calibração foram construídas usando 0, 0,25, 1,0 e 2,5 g de alface e as condições ótimas de SPME, verificando-se diferenças significativas entre as curvas de calibração. Somente as regressões obtidas para o *fludioxonil* e para a *iprodione* não apresentaram efeito significativo da quantidade de alface. Os LDs e LQs obtidos usando 2,5 g de amostra foram inferiores aos LMR legislados, exceto para os compostos *metalaxyl* e *pirimicarb* (39).

O composto *phosmet* foi uma boa escolha como padrão interno (PI) atendendo a que apresenta características cromatográficas semelhantes aos compostos em estudo. A recuperação média do PI foi $97,1 \pm 7,5\%$, a repetibilidade (RSD (%)) $n = 6$ para ensaios no mesmo dia) foi 4,1 % e a precisão intermédia (RSD (%)), $n = 17$ em cinco dias diferentes) foi 7,7%. Estes valores são comparáveis à literatura para a análise de resíduos de pesticidas em sumos por SPME-HPLC (40).

8.3. Avaliação de pesticidas em tomate por QuEChERS-DLLME-HPLC/DAD e QuEChERS-DLLME –GC/MS

No Capítulo 4 foi otimizado e validado um novo método de preparação da amostra para a determinação de níveis vestigiais de treze resíduos de pesticidas em tomate por HPLC/DAD. O desenvolvimento de um método analítico que permita a extração simultânea de 7 herbicidas (*2,4-D*, *bentazone*, *dicamba*, *diuron*, *foramsulfuron*, *mesotrione*, *tembotrione*), 3 inseticidas (*acetamiprid*, *deltamethrin* *methomyl*) e 3 fungicidas (*cymoxanil*, *metalaxyl-M*, *pyraclostrobin*) num vegetal como o tomate é um desafio, porque estes compostos apresentam grandes diferenças de polaridade, solubilidade, volatilidade e pKa. Adicionalmente, a matriz apresenta uma composição

complexa e diversos interferentes podem ser extraídos juntamente com os compostos de interesse.

Pesticidas polares, tais como, *methomyl*, *acetamiprid*, *dicamba*, *cymoxanil*, *foramsulfuron*, *mesotrione*, *bentazone*, *2,4-D* podem ser analisados por cromatografia líquida. Assim, a otimização das condições cromatográficas do método de HPLC-DAD incluiu eluição por gradiente com ácido fórmico e tampão formato (10 mM, pH = 3) como fase aquosa e acetonitrilo, como fase orgânica. Nestas condições foi possível a análise de pesticidas com características ácidas. Dois compostos foram usados como PI, o *4-nitrophenyl acetate* (NPA) e o *2-nitrophenyl ether* (NDPE), estes compostos foram selecionados porque não estão presentes no tomate e têm eluição cromatográfica adequada com picos bem resolvidos e espectro de UV-VIS diferente do dos pesticidas e dos interferentes.

No Capítulo 4 desta dissertação foi desenvolvido um método inovador de preparação da amostra para a análise de resíduos de pesticidas, combinando o método de QuEChERS com o método de DLLME.

Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas na extração de pesticidas é a técnica de QuEChERS (41), que é baseada numa partição líquido-líquido, seguida de um passo de limpeza por d-SPE, sendo comum na análise de géneros alimentares, como os vegetais, devido à elevada quantidade de água que contêm (42). A maior desvantagem desta técnica é o baixo fator de enriquecimento alcançado, o que pode resultar em LDs superiores comparativamente com outras técnicas (43).

A técnica de DLLME, por outro lado, também se tornou muito popular na preparação de amostras ambientais, por ser uma técnica rápida, fácil de elaborar e com um grande fator de enriquecimento (44). A análise de pesticidas é, provavelmente, onde se encontram a maior parte das aplicações da técnica de DLLME. Das quais, grande parte, são aplicações da técnica em diferentes tipos de matrizes de água (nomeadamente, água da rede pública, rios, poços, entre outras). No entanto, outras matrizes aquosas, como por exemplo, vinhos ou sumos de fruta também foram analisadas. A aplicabilidade desta técnica a matrizes sólidas é muito menor, provavelmente, por causa da complexidade das amostras e também devido à necessidade de desenvolver um processo de pré-tratamento anterior, baseado, principalmente, na extração com solvente ou água (45).

Neste contexto, a utilização das técnicas de QuEChERS e DLLME em conjunto leva a uma complementaridade, podendo ser superadas algumas das limitações de cada uma das técnicas. Adicionalmente, permite reduzir os compostos de matriz que são extraídos juntamente com os resíduos de pesticidas, através do processo de purificação por d-SPE. A abordagem de QuEChERS é muito flexível, podendo sofrer diferentes modificações dependendo das propriedades dos compostos em estudo, da composição da matriz,

equipamento e técnicas analíticas disponíveis no laboratório. No entanto, este passo de purificação pode reduzir as recuperações de alguns resíduos de pesticidas, principalmente porque num método multiclasse e multirresíduo são analisados resíduos de pesticidas com propriedades muito diversas (41). Por este motivo e de forma a obter um compromisso entre o passo de limpeza e as recuperações dos diferentes resíduos, o ideal é efetuar a otimização da d-SPE através de RSM.

A metodologia de d-SPE permite o uso de diferentes combinações de sorventes em quantidades apropriadas de forma a atuar como um filtro químico e remover as interferências de matriz com a menor retenção possível dos compostos de interesse (46). No caso da matriz do tomate, os principais interferentes encontrados foram o ácido clorogénico, a rutina e diferentes carotenoides (principalmente o licopeno). Assim, no Capítulo 4 foi utilizada uma mistura de três sorventes: C₁₈, PSA e GCB. O C₁₈ é utilizado na remoção de compostos lipídicos e utilizado em combinação com a PSA para a remoção de compostos apolares (46). A PSA é importante na remoção de interferentes menos polares como ácidos gordos, flavonoides, ácidos orgânicos, açúcares e alguns pigmentos (41). O GCB, que possui uma elevada afinidade para moléculas com estrutura planar, é extremamente eficiente na remoção de pigmentos como clorofilas e carotenoides (42).

Os 13 pesticidas em estudo foram isolados através de partição líquido-líquido com acetonitrilo, e auxílio de sulfato de magnésio e NaCl. Após purificação por d-SPE, efetuou-se a concentração final dos resíduos de pesticidas por DLLME. O solvente extrator do QuEChERS foi usado como solvente dispersor de DLLME. Foi dada especial atenção à otimização da purificação da amostra por d-SPE no QuEChERS e à natureza e quantidade de solvente extrator, assim como, o pH da amostra e o efeito de *salting out* na metodologia de DLLME. Verificou-se que a utilização de clorofórmio como solvente extrator e solução tampão com pH=1 aumentavam a extração da maior parte dos pesticidas em estudo, tal como revelaram os cromatogramas dos extratos.

A otimização do processo de purificação da amostra permitiu diminuir as interferências e concentrar os compostos em estudo. A RSM foi utilizada para otimizar as quantidades de PSA e de carvão ativado, no processo de purificação por d-SPE na técnica de QuEChERS, e para otimizar o volume de solvente de extração (clorofórmio) e a percentagem de cloreto de sódio adicionado na metodologia de DLLME.

A extração simultânea de pesticidas, com propriedades diferentes, a partir de uma matriz complexa como o tomate requer um compromisso entre a extração de cada composto individual e as condições globais ótimas. Com este objetivo selecionou-se a resposta analítica do resíduo do pesticida que possuía o LMR mais baixo de todos os compostos

estudados (o *furamsulfuron*), os dois padrões internos e uma interferência analítica, e estabeleceu-se que o desejável era maximizar a resposta analítica do composto *furamsulfuron* e dos padrões internos, e minimizar a resposta analítica do interferente. O desenho experimental obtido por CCD com 30 ensaios indicou que as condições ótimas de extração eram 100 mg de PSA e 5,26 mg de carvão ativado na purificação, bem como 4% de cloreto de sódio e 400 µL de clorofórmio no processo de DLLME. Estas condições foram testadas experimentalmente em 6 ensaios e verificou-se concordância entre a resposta prevista para cada composto e os respectivos resultados experimentais.

A verificação da performance analítica do método proposto foi realizada por calibrações na matriz, ensaios de recuperação e avaliação da exatidão realizados em amostras de tomate biológico. As curvas de calibração foram obtidas usando um modelo de regressão linear ponderada. Foi possível obter LQs para todos os pesticidas inferiores aos LMR estabelecidos na UE (39). A comparação do declive das curvas de calibração obtidas a partir da análise de padrões dissolvidos em acetonitrilo e em extratos de amostras fortificadas (calibrações na matriz) indicaram diferenças significativas. Deste modo, de acordo com as recomendações da SANCO, a quantificação deve ser realizada usando curvas de calibração com amostra de tomate (40). Os valores de recuperação para 2 níveis de concentração variaram entre 85,7-115,6%. A repetibilidade (para dois níveis de concentração, e realizada no mesmo dia em triplicado) foi inferior a 14,2% e a precisão intermédia (para dois níveis de concentração, e avaliada em três dias diferentes) foi inferior a 17,4%.

No Capítulo 5 desta dissertação também foi desenvolvida uma metodologia para a extração de diferentes resíduos de pesticidas em matrizes de tomate, mas neste caso a análise dos resíduos de pesticidas foi efetuada por GC/MS, que é uma técnica muito mais robusta e que predomina na análise de multirresíduos de pesticidas, oferecendo como vantagens a alta eficiência de separação e fiabilidade de identificação dos diferentes resíduos (43). Neste caso foi efetuada uma abordagem semelhante à desenvolvida no Capítulo 4, em que a extração dos compostos foi efetuada através de uma partição líquido-líquido, seguida por um passo de DLLME, com a alteração de não se proceder ao passo de purificação por d-SPE, devido à maior eficiência e robustez do instrumento de GC/MS na análise dos resíduos de pesticidas. O solvente extrator no DLLME foi tetracloreto de carbono.

O método foi validado para 30 resíduos de pesticidas, potencialmente utilizados para controlar peste nos tomates produzidos em estufa. Os compostos em estudo incluíram 10 inseticidas (*pirimicarb*, *thiamethoxam*, *cyromazine*, *ethoprophos*, *tefluthrin*, *chlorpyrifos*, *chlorpyrifos-methyl*, *bifenthrin*, *λ-cyhalothrin*, *(α,β)Endosulfan*), 19 fungicidas (*azoxystrobin*,

iprodione, tolyfluanid, captan, cyprodinil, difenoconazole, fenhexamid, fludioxonil, folpet, tebuconazole, chlorothalonil, dichlofluanid, kresoxim-methyl, metalaxyl-M, tetraconazole, trifloxystrobin, dimoxystrobin, picoxystrobin, e vinclozolin) e 1 herbicida (*atrazine*). O procedimento de preparação da amostra foi otimizado para permitir que todos os pesticidas pudessem ser analisados abaixo do seu LMR (39). Além disso, o método é rápido, pouco dispendioso e assegura um elevado fator de enriquecimento.

Os efeitos de matriz foram avaliados através da razão entre os declives das curvas de calibração na matriz de tomate (livre de pesticidas) e pela injeção direta de soluções padrão. Dependendo da percentagem de diminuição/aumento do declive os efeitos de matriz foram considerados suaves (entre $\pm 20\%$ e 0%), médios (entre $\pm 50\%$ e $\pm 20\%$), e fortes, quando eram superiores a $\pm 50\%$. Somente nove pesticidas revelaram um efeito de matriz suave, 7 apresentaram um efeito médio e 14 apresentaram um efeito forte. Optou-se por efetuar as curvas de calibração em matriz, com amostras de tomate fortificadas e extraídas pelo mesmo processo que as amostras de tomate reais.

Ensaio de recuperação e de repetibilidade, para avaliar a exatidão e precisão do método foram realizados na matriz tomate para dois níveis de fortificação. As recuperações para todos os pesticidas (exceto *vinclozolin* e *thiamethoxam*) variaram entre 70-110% para os dois níveis de concentração. O RSD foi inferior a 17% para todos os pesticidas em estudo, exceto para o composto *cyromazine* e o composto *difenoconazole* que foi de 20%. A recuperação e a repetibilidade estão de acordo com as regras da SANCO (15).

A metodologia validada é adequada para análises de rotina atendendo a que permite a análise de um elevado número de amostras num só dia de trabalho.

Referências

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions. 2006; Disponível em: <http://www.clsi.org/source/orders/free/c24-a3.pdf> [acedido em 2012].
2. Torres CM, Pico Y, Manes J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 1996;754(1-2):301-31.
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
4. Commission of the European Communities. The implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. 2007; Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/sec_2007_1635_en.pdf [acedido em 2012].
5. United Nations Environment Programme (UNEP) Ridding the world of POPs: a guide to the Stockholm convention on persistent organic pollutants. 2005; Disponível em: http://www.pops.int/documents/guidance/beg_guide.pdf [acedido em 2012].
6. European Parliament and the Council of the European Union. Decision nº 2455/2001/EC establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Official Journal of the European Communities*. Serial L, nº 311, 1-5.
7. US Environmental Protection Agency (EPA). Final List of Initial Pesticide Active Ingredients and Pesticide Inert Ingredients to be Screened Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. 2009; Disponível em: http://www.epa.gov/endo/pubs/final_list_frn_041509.pdf [acedido em 2012].
8. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR). Pesticidas a pesquisar em 2011 em águas para consumo humano. 2012; Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/Home.aspx> [acedido em 2012].
9. Conselho da União Europeia. Diretiva 98/83/CE do conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Série L, nº330, 32-54.

10. Ramautar R, Jong GJ, Somsen GW. Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2009-2011. *Electrophoresis*. 2012;33(1):243-50.
11. Nunez O, Gallart-Ayala H, Martins CP, Lucci P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2012;1228:298-323.
12. Ramos L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J Chromatogr A*. 2012;1221:84-98.
13. Poole CF. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):241-50.
14. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Methods Definitions and Terminology, Q2A Guideline. 1994; Disponível em: <http://www.ikev.org/haber/stabilite/kitap/35%201.7%20Stability%20Workshop%20ICH%20Q2A%20C%20.pdf> [acedido em 2012].
15. Directorate General for Health & Consumers - European Commission (SANCO). Document nº SANCO/10684/2009 Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. 2010; Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf [acedido em 2012].
16. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95) Q2B. 1995; Disponível em: http://www.uam.es/personal_pas/txrf/MU5.pdf [acedido em 2012].
17. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. 2001; Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf> [acedido em 2012].
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved Guideline, C43-A. Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Confirmation of Drugs. 2002; Disponível em: <http://www.clsi.org/source/orders/free/c43-a2.pdf> [acedido em 2012].
19. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998; Disponível em: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf> [acedido em 2012].
20. Eurachem/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2000; Disponível em: <http://www.measurementuncertainty.org/pdf/QUAM2000-1.pdf> [acedido em 2012].

21. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):20.
22. International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725-1:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions, (1994).
23. International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (1994).
24. International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725-3:1994/Cor 1:2001. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method, (2001).
25. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução nº 899, de 29/05/2003 2003; Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm [acedido em 2012].
26. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008 2003; Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf [acedido em 2012].
27. Kirkup L, Mulholland M. Comparison of linear and non-linear equations for univariate calibration. *J Chromatogr A*. 2004;1029(1-2):1-11.
28. Hibbert DB. The uncertainty of a result from a linear calibration. *The Analyst*. 2006;131(12):1273-8.
29. Miller JN, Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5ª ed. Inglaterra: Pearson Education Limited; 2005.
30. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Topic Q 2 (R1) 2005; Disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf [acedido em 2012].
31. Directorate General for Health & Consumers - European Commission (SANCO). SANCO/12495/2011-Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2011. Disponível em: <http://www.crl->

pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_12495_2011_upload2.pdf [Acedido em 2012].

32. Pawliszyn J. Solid-phase microextraction: Theory and practice. New York: Wiley-VCH; 1997.
33. Pico Y, Fernandez M, Ruiz MJ, Font G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J Biochem Bioph Meth.* 2007;70(2):117-31.
34. Balasubramanian S, Panigrahi S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Tech.* 2011;4(1):1-26.
35. Aulakh JS, Malik AK, V K, Schmitt-Kopplin P. A review on solid phase micro extraction-high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit Rev Anal Chem.* 2005;35(1):71-85.
36. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* 2008;76(5):965-77.
37. Stalikas C, Fiamegos Y, Sakkas V, Albanis T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *J Chromatogr A.* 2009;1216(2):175-89.
38. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *WIREs Comput Stat.* 2010:128-49.
39. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 70, 1-16.*
40. Sagratini G, Manes J, Giardina D, Damiani P, Pico Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1147(2):135-43.
41. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A.* 2010;1217(16):2548-60.

42. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J Aoac Int.* 2003;86(2):412-31.
43. Cunha SC, Fernandes JO. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218(43):7748-57.
44. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J Chromatogr A.* 2010;1217(16):2342-57.
45. Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trac-Trend Anal Chem.* 2010;29(7):728-51.
46. Lehotay SJ, Mastovska K, Yun SJ. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J Aoac Int.* 2005;88(2):630-8.

Capítulo 9

**Avaliação da exposição do consumidor aos
resíduos de pesticidas através da ingestão de
vegetais crus, produzidos em estufa**

Capítulo 9. Avaliação da exposição do consumidor aos resíduos de pesticidas através da ingestão de vegetais crus, produzidos em estufa

Produtos hortícolas, como a alface e o tomate são, geralmente, consumidos crus, sem qualquer processamento para reduzir ou eliminar contaminantes. Deste modo, a forma como são cultivados, colhidos, classificados, embalados e distribuídos é fundamental para garantir a sua segurança, reduzindo assim o risco de doença para os consumidores. A alface e o tomate são culturas de regadio, que utilizam uma agricultura intensiva, geralmente em estufas. Estes hortícolas são produzidos tipicamente durante a primavera-verão no entanto, no sul da Europa, são produzidos durante todo o ano em estufas (1), permitindo aos consumidores o acesso a alface e tomate frescos, mesmo durante o inverno.

Estufas comerciais são amplamente utilizadas para a produção de frutas e vegetais de qualidade superior, oferecendo condições de crescimento ideais para estas plantas (2). No entanto, a temperatura moderada e a elevada humidade que promovem o desenvolvimento da planta também contribuem para a propagação de pragas e doenças. Além disso, nas estufas, as culturas seguem-se umas às outras, numa rotação ininterrupta durante todo o ano, favorecendo a sobrevivência de pragas e doenças. Na verdade, os requisitos no interior da estufa necessários para a produção de melhor alface e tomate também são favoráveis ao desenvolvimento de doenças fúngicas, como o míldio, a requeima-do-tomateiro (*Phytophthora infestans*) e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (3), especialmente durante o inverno quando a humidade no interior da estufa é mais elevada. Também os insetos e ácaros estão sempre presentes nas estufas mas, muitas vezes, o mesmo não acontece com os seus inimigos naturais, que servem para os controlar (4). Neste contexto, estratégias integradas de controlo de pragas requerem a pulverização com diferentes tipos de fungicidas e inseticidas (1, 2). Uma deteção, diagnóstico e ação atempada é essencial. No entanto, o uso inadequado destes produtos, por exceder as doses recomendadas, e/ou por não cumprir o intervalo de segurança entre a sua aplicação e a colheita dos hortícolas, pode deixar resíduos indesejados que irão ser prejudiciais para o consumidor. A preparação e aplicação destes produtos químicos deve ser efetuada tendo em conta as boas práticas, o respeito pelas indicações de aplicação, bem como o intervalo de segurança. Adicionalmente, a monitorização de resíduos de pesticidas nestes hortícolas de estufa é essencial para garantir a segurança alimentar dos consumidores, evitando bioacumulação de resíduos de pesticidas através da cadeia alimentar (5).

A presença e a prevalência de diversos contaminantes, potencialmente prejudiciais, nos alimentos e meio ambiente continua a ser uma fonte de inquietação e por isso requer uma atenção contínua por parte do consumidor (6). Os resíduos de pesticidas mais comumente encontrados em amostras de origem vegetal são aqueles que resultam de produtos fitofarmacêuticos intencionalmente aplicados às plantas para combater pragas de invertebrados (inseticidas, acaricidas, entre outros) e doenças das mesmas (fungicidas) (7). Assim, programas de monitorização de resíduos de pesticidas são implementados em todo o mundo, de forma a assegurar que os consumidores não estão expostos a níveis inaceitáveis de pesticidas e que apenas os pesticidas aprovados pelas autoridades são utilizados e com uma aplicação correta no que diz respeito ao género agrícola, a dose aplicada, o tempo, e aos intervalos de segurança (8). O produto alimentar pode ser comercializado e consumido desde que cumpra com os LMR estabelecidos pelas autoridades.

Os LMR têm um papel importante no cumprimento das recomendações de aplicação dos produtos fitofarmacêuticos, sendo também úteis no cumprimento dos limites legais do comércio internacional e, além disso, desencorajam a utilização abusiva de produtos fitofarmacêuticos (9). Muitos países têm as suas leis nacionais que definem os limites e condições em que os diferentes produtos podem ser utilizados. Na UE estes limites são estabelecidos pelo Regulamento (UE) n.º 396/2005 (10). Nesta dissertação os métodos de análise de pesticidas validados tiveram sempre em consideração estes limites.

Na UE a segurança alimentar é garantida através de programas de monitorização e por meio de medidas coerentes "desde a exploração agrícola até à mesa" (*"from the farm to the fork"*), assegurando simultaneamente o funcionamento efetivo do mercado interno (11). Assim, são os governos dos diferentes países os responsáveis pelo acompanhamento regular dos resíduos de pesticidas nos alimentos (8). Mas para além dos governos nacionais, as atividades de monitorização ou de vigilância também são realizadas por organizações não-governamentais ou cientistas, que estudam a ocorrência e destino dos resíduos de pesticidas em relação ao meio ambiente, saúde, alimentação, agricultura, ou mesmo seres humanos.

9.1. Monitorização de pesticidas em amostras de alface produzidas em estufa durante o inverno

A monitorização a nível europeu do cumprimento dos respetivos LMR nos diferentes géneros alimentares é levada a cabo pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), no relatório apresentado sobre os resíduos pesticidas em 2009 (8), a alface foi o

segundo maior grupo de amostras analisadas dentro do grupo dos vegetais, sendo o género alimentar mais analisado o das *Solanaceae*, onde também se encontra por exemplo, o tomate. Num outro relatório de monitorização português, respeitante a resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal, dos finais dos anos 90, as alfaces (principalmente de inverno) foram os produtos vegetais com maior frequência de amostras com resíduos superiores aos LMR, sendo na maioria dos casos de fungicidas (12).

Neste enquadramento, a avaliação dos resíduos de pesticidas na alface é de especial importância para a segurança alimentar. A alface é um vegetal muito consumido, geralmente sem processamento, por isso, se existirem resíduos de pesticidas no momento da colheita, o consumidor está fortemente exposto aos mesmos (13). No Capítulo 3 a técnica de SPME-HPLC/DAD otimizada e validada foi aplicada na monitorização de pesticidas vulgarmente usados na produção de alface (*Lactuca sativa*) em estufa, durante o inverno, o que permitiu estudar a dissipação de alguns pesticidas desde a aplicação até à colheita, com o objetivo de avaliar o cumprimento das boas práticas agrícolas.

As amostras de alface (*L. sativa* L. var. *Capitata*) foram produzidas em estufa de plástico com 300 m², situada na Póvoa de Varzim, durante os meses de dezembro e janeiro. A densidade de plantação foi de 12 plantas/m² (30 cm x 25 cm). A cultura foi irrigada sempre que necessário, com um total de 150 L/m². Os pesticidas foram pulverizados quando o produtor achou adequado tendo em atenção a avaliação do risco para as principais pragas e doenças. A aplicação dos produtos fitofarmacêuticos seguiu as boas práticas agrícolas, de acordo com as informações fornecidas por quem aplicou os produtos.

Amostras de alface (1 kg ou, pelo menos, 10 unidades, dependendo da fase de crescimento) foram colhidas antes da adição de produtos fitofarmacêuticos (amostras livres de pesticidas) e 0, 1, 3, 6, 7, 9 e 14 dias após a adição dos mesmos, respetivamente T0, T1, T3, T6, T7, T9, T14, com o intuito de avaliar o comportamento de dissipação dos compostos usados, no intervalo entre a aplicação e a colheita, em conformidade com a Diretiva 2002/63/CE (14) e SANCO/10684 / 2009 (15). As amostras de alface foram imediatamente transportadas para o laboratório, congeladas durante 2 horas e trituradas com equipamento adequado.

A toma de alface a utilizar na extração por SPME teve que ser escolhida em função da quantidade de resíduos de pesticidas esperada, que variou entre 2,5 e 1 g. Nas amostras sem pesticidas ou com teores próximos dos limites de quantificação usaram-se 2,5 g de toma, que é a quantidade adequada para a obtenção de limites de quantificação

inferiores aos LMR. No entanto, foi necessário reduzir a toma das amostras com elevada quantidade de pesticidas, para que as concentrações dos mesmos não extrapolassem a zona de linearidade, nem ocorresse saturação do sinal analítico no detetor. Atendendo a que a comparação estatística das curvas de calibração com diferentes quantidades de alface (0 g, 0,25 g, 1 g e 2,5 g), revelou diferenças significativas no declive, tal como descrito nos Capítulos 2 e 8, a quantificação dos pesticidas nas amostras foi realizada recorrendo a 3 calibrações diferentes. Deste modo, as curvas de calibração obtidas com 2,5 g de alface foram usadas para a quantificação das amostras colhidas antes da adição de produtos fitofarmacêuticos (amostras sem pesticidas) e das amostras de alface T7, T9 e T14. As curvas de calibração obtidas com 1 g de alface foram usadas para a quantificação das amostras T3 e T6 e as curvas de calibração obtidas com 0,25 g de alface foram usadas para a quantificação das amostras T0 e T1.

A análise das amostras de alface revelou que os produtos fitofarmacêuticos aplicados tinham como princípios ativos o composto *fenhexamid* e o composto *folpet*. Estes produtos apresentam, respetivamente, intervalos de segurança de 7 e 14 dias para esta cultura. Somente estes dois pesticidas foram quantificados em algumas das amostras de alface. Os restantes pesticidas determinados neste trabalho (*azoxystrobin*, *cyprodinil*, *fludioxonil*, *iprodione*, *metalaxyl M*, *tolyfluanid*, *acetamiprid*, *pirimicarb*), não foram detetados nas amostras analisadas.

A concentração do composto *folpet* foi de 92,8; 53,4; 22,9; 17,9; 7,45; 1,85 mg/kg, respectivamente, para T0, T1, T3, T6, T7, T9 e não foi detetado no T14, o tempo de segurança deste pesticida é de 14 dias e o LMR em alface é de 2 mg/kg. A concentração do composto *fenhexamid* foi de 158,1; 76,2; 31,0; 27,3; 7,24; 0,87 mg / kg, respectivamente, para T0, T1, T3, T6, T7, T9 dias, e não foi detetado no T14, o tempo de segurança deste pesticida é de 7 dias e o LMR em alface é 30 mg/kg. Os resultados obtidos estão de acordo com a informação fornecida pelo produtor e com o Regulamento (CE) n.º 396/2005 (10).

Outra forma de analisar estes estudos de dissipação pode ser, segundo a literatura (16, 17), com base na realização de um ajuste linear, em que a taxa de dissipação de resíduo de pesticida é derivada do ajuste dos dados experimentais para uma função de pseudo primeira ordem cinética. Em que se tem:

$$\frac{-d[R]}{dt} = k[R]$$

$$\ln[R] = \ln[R_0] + kt \text{ (fórmula geral } y = a + kt \text{)}$$

Em que (R) é a média dos níveis de resíduo de pesticida na alface a t dias após o tratamento, (R₀) é a concentração inicial do resíduo e (k) é a constante da taxa de

degradação. Para testar o coeficiente de correlação (r) obtido, calcula-se o parâmetro D , que permite avaliar se existe correlação entre o resíduo e o tempo, e se o respetivo coeficiente de correlação é significativamente diferente de zero:

$$D = r - \frac{t}{\sqrt{t^2 + (n - 2)}}$$

Em que r é o valor absoluto do coeficiente de correlação obtido e t é o valor de t student tabelado, para $n-2$ graus de liberdade.

Tabela 1: Dados do ajuste linear de dissipação para os compostos *folpet* e *fenehexamid* em alface, com os valores (R_0) correspondentes aos níveis de resíduos iniciais (mg/kg), o tempo de semi-vida para o resíduo de pesticida ($t_{1/2}$) (dias) e o tempo necessário para atingir o LMR (t_{MLR}) (dias) para os dois fungicidas estudados.

Fungicida	R_0	$t_{1/2}$	t_{LMR}	r	k	D
<i>folpet</i>	4,53	1,56	8,66	0,9790	-0,4433	0,1677
<i>fenehexamid</i>	5,06	1,42	3,41	0,9334	-0,4871	0,1220

Como descrito anteriormente, a concentração inicial do composto *folpet* era de 92,8 mg/kg, atingindo um tempo de semi-vida do resíduo 1,56 dias após a pulverização. O tempo necessário para atingir o LMR era de 8,66 dias, o que está de acordo com os dados experimentais obtidos e também com a legislação, que define 14 dias de intervalo de segurança em estufa. No caso do composto *fenehexamid*, a sua concentração inicial era de 158,1 mg/kg e o tempo de semi-vida do respetivo resíduo de 1,42 dias, sendo o tempo necessário para atingir o LMR de 3,41 dias, o que vai também de encontro ao descrito anteriormente, pois o seu resíduo encontra-se a baixo desse nível ao fim de 7 dias.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que no final do intervalo de segurança estipulado os resíduos de pesticidas já se encontravam em níveis inferiores ao LMR estabelecido, em conformidade com regulamento (UE) nº 396/2005 (10) e com as expectativas do produtor.

Como esperado, se o produto fitofarmacêutico é usado de acordo com as recomendações da rotulagem, os resíduos que ocorrem não excedem os LMR (18).

9.2. Monitorização de resíduos de pesticidas em amostras de tomate produzido em estufa durante o inverno

O tomate (*Lycopersicum esculentum*) é um dos vegetais mais consumidos no mundo (19). Geralmente, a sua produção requer o uso intensivo de produtos fitofarmacêuticos, por apresentar grande suscetibilidade a insetos e doenças durante a fase de cultivo, o que causa preocupações quanto à provável contaminação do produto final e justifica a necessidade de monitorização de resíduos de pesticidas no tomate.

A dissipação dos resíduos de pesticidas nos géneros agrícolas pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como, a chuva, o vento, as reações químicas induzidas por oxigénio, a luz, a humidade ou as enzimas das plantas (20). O estudo descrito no Capítulo 5 foi realizado em tomates produzidos em estufa, por isso, alguns dos fatores referidos anteriormente não estão presentes, levando a níveis superiores de resíduos de pesticidas (3, 21).

No Capítulo 5 desta dissertação foram monitorizados os níveis de 30 resíduos de pesticidas em 20 amostras de tomates produzidos durante o inverno em estufas. A amostragem incluiu as 4 variedades mais consumidas (8 amostras de tomate *beefsteak*, 6 amostras de *grape-tomato-vine*, 5 amostras de *plum*, 1 *cherry*) e foi realizada de acordo com a Directiva 2002/63/EC (14).

Não foi detetado nenhum pesticida em 13 amostras e somente 7 amostras continham um ou dois resíduos de pesticidas. Dos 30 compostos em estudo, 24 não foram detetados em nenhuma amostra. Somente 6 resíduos foram detetados, incluindo 2 estrobirulinas (*azoxystrobin* e *trifloxystrobin*), um piretróide (*λ-cyhalothrin*), uma anilida (*fenhexamid*), uma sulfamida (*tolyfluanid*) e uma pirimidina (*cyprodinil*). As suas concentrações variaram entre um nível inferior ao LQ do método e 0,33 mg/kg de amostra. Todas as amostras continham concentrações de resíduos de pesticidas abaixo do LMR legislado pelo Regulamento (UE) n.º 396/2005 (10). No entanto, é de estranhar o facto de serem encontrados resíduos de *tolyfluanid*, que geralmente não é utilizado em Portugal. Os seus limites encontram-se nos anexos II e III, com LMR temporários, porque ainda não foi tomada uma decisão de inclusão no Anexo I do Regulamento (UE) n.º 396/2005 (22).

Referências

1. Bidari A, Ganjali MR, Norouzi P, Hosseini MRM, Assadi Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chem.* 2011;126(4):1840-4.
2. Acquaah G. Horticulture: principles and practices. 2ª ed. New Jersey: Pearson Education; 2002.
3. Angioni A, Porcu L, Dedola F. Determination of famoxadone, fenamidone, fenhexamid and iprodione residues in greenhouse tomatoes. *Pest Manag Sci.* 2012;68(4):543-7.
4. Nelson PV. Greenhouse operation and management. 5th ed. ed. New Jersey: Prentice Hall; 1998.
5. Jardim ANO, Caldas ED. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control.* 2012;25(2):607-16.
6. Raz SR, Haasnoot W. Multiplex bioanalytical methods for food and environmental monitoring. *Trac-Trend Anal Chem.* 2011;30(9):1526-37.
7. Tadeo JL. Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007.
8. European Food Safety Authority (EFSA). The 2009 European Union Report on Pesticide Residues in Food. 2011; Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2430.htm> [acedido em 2012].
9. Winter CK. Pesticide Tolerances and Their Relevance as Safety Standards. *Regul Toxicol Pharm.* 1992;15(2):137-50.
10. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 70, 1-16.*
11. European Food Safety Authority (EFSA). Saúde e Consumidores - Alimentos. 2012; Disponível em: http://ec.europa.eu/food/intro_pt.htm [acedido em 2012].

12. Amaro P. A redução dos riscos dos pesticidas pela protecção integrada. Lisboa: ISA/Press; 2003.
13. Vandeman A, Leblanc M, Vasavada U. The Impact of Integrated Pest-Management on Pesticide Use in the United-States Vegetable Industry. *Abstr Pap Am Chem S.* 1992;203:280.
14. Comissão das Comunidades Europeias. Diretiva 2002/63/CE que estabelece métodos de amostragem comunitários para o controlo oficial de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de produtos de origem vegetal ou animal e revoga a Directiva 79/700/CEE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Série L*, nº 187, 30-43.
15. Directorate General for Health & Consumers - European Commission (SANCO). Document nº SANCO/10684/2009 Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. 2010; Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf [acedido em 2012].
16. Fenoll J, Hellin P, Camacho MD, Lopez J, Gonzalez A, Lacasa A, et al. Dissipation rates of procymidone and azoxystrobin in greenhouse grown lettuce and under cold storage conditions. *Int J Environ an Ch.* 2008;88(10):737-46.
17. Marin A, Oliva J, Garcia C, Navarro S, Barba A. Dissipation rates of cyprodinil and fludioxonil in lettuce and table grape in the field and under cold storage conditions. *J Agr Food Chem.* 2003;51(16):4708-11.
18. Lozowicka B, Jankowska M, Kaczynski P. Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food Control.* 2012;25(2):561-75.
19. Engindeniz S. Economic analysis of pesticide use on processing tomato growing: A case study for Turkey. *Crop Prot.* 2006;25(6):534-41.
20. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trac-Trend Anal Chem.* 2011;30(6):814-26.
21. Garau VL, Angioni A, Del Real AA, Russo M, Cabras P. Disappearance of azoxystrobin, pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil on tomatoes in a greenhouse. *J Agr Food Chem.* 2002;50(7):1929-32.
22. Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) nº 149/2008 que altera o Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L*, nº 58, 1-398.

Capítulo 10

Contaminação das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva

Capítulo 10. Contaminação das águas subterrâneas em zonas de agricultura intensiva

O uso generalizado de produtos fitofarmacêuticos para fins agrícolas teve como consequência o aparecimento dos respetivos resíduos em várias matrizes ambientais (1). A agricultura tornou-se assim na principal causa de poluição difusa, bastante difícil de enfrentar e prevenir, uma vez que uma enorme variedade de produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes são espalhados nos campos agrícolas (2), distribuindo-se pelo solo, água, ar, sedimentos e biota. No entanto, cada produto fitofarmacêutico apresenta um comportamento ambiental complexo, resultante de vários processos físicos, químicos e biológicos, que determinam o seu transporte e transformação (3). Sendo-lhes inerente uma certa toxicidade, são suscetíveis de causar impacto ambiental. Quantidades substanciais (0,1 a 5%) dos produtos fitofarmacêuticos aplicados podem passar dos campos agrícolas para os compartimentos aquáticos através de processos de escoamento e drenagem (4). O livro *Silent Spring* de Rachel Carson, publicado em 1962, foi um importante alerta para os danos ambientais provocados pelos pesticidas. Esta foi a primeira obra a detalhar os efeitos adversos da utilização desregrada de pesticidas e o custo ambiental dessa contaminação para a sociedade. As constatações de contaminações ambientais generalizadas e de bioacumulação de pesticidas ao longo das cadeias tróficas, não tardaram.

Nos últimos anos, a crescente consciencialização dos riscos relacionados com o uso intensivo de produtos fitofarmacêuticos tem conduzido a uma atitude mais crítica e cautelosa relativamente ao uso destes compostos. Ao mesmo tempo, foi adotada legislação salvaguardando o LMR de pesticidas na água de consumo, bem como regulamentos para eliminar ou restringir o uso e a produção de uma série de produtos fitofarmacêuticos (5).

No caso da UE, a legislação estabelece como valores paramétricos de pesticidas na água de consumo concentrações, em que 0,1 µg/L é o limite máximo para um único pesticida e 0,5 µg/L para o somatório de todos os resíduos de pesticidas encontrados, através da Diretiva 98/83/CE (6). Esta preocupação estende-se à problemática da poluição da água em geral, que é regulamentada pela Diretiva 2000/60/CE (7) e pela Diretiva 2006/118/CE (8). No entanto, os resíduos de pesticidas continuam a estar presentes no ambiente e podem causar efeitos adversos para a saúde humana e para as espécies aquáticas (vertebrados, invertebrados e plantas) (9). No que diz respeito à água subterrânea (3), é de especial importância conhecer a origem dos pesticidas detetados neste compartimento, que pode ser pontual (derrames durante a preparação da calda) ou

difusa (aplicação de pesticidas no campo agrícola e em campos circundantes). A lixiviação é também responsável pela presença de pesticidas nas águas subterrâneas. Os pesticidas pouco voláteis, com elevada solubilidade na água e elevada persistência são mais suscetíveis de lixiviação. Quando aplicados repetidamente em zonas com regas intensivas, e solos muito permeáveis, e em que a água subterrânea se encontra a pouca profundidade, o risco de ocorrência de contaminações deste recurso é, geralmente, elevado. Neste contexto, a monitorização dos resíduos de pesticidas em águas subterrâneas, é uma ferramenta muito útil para a avaliação do estado atual da qualidade das águas, e ajuda ter uma perspetiva histórica da poluição nestes locais, com o intuito de implementação de medidas futuras de remediação, se necessário, e avaliação do risco de exposição das populações aos referidos resíduos (10).

10.1. Monitoração das concentrações de pesticidas, na água de poços e furos, durante um ano, numa zona de horticultura intensiva

Os vegetais são produtos muito perecíveis e, por isso, as grandes explorações de produção situam-se, geralmente, perto dos centros urbanos (11). O aumento da produção de vegetais tem sido conseguido através da intensificação da agricultura e do aumento da rentabilidade das produções (12). No entanto, este processo acarreta custos ambientais elevados, no que respeita ao consumo de água e à sua contaminação.

A água é um recurso natural indispensável à vida, mas é muito vulnerável e cada vez mais escassa, por isso é urgente a sua gestão rigorosa e sustentável. De acordo com uma análise elaborada no âmbito do Plano Nacional da Água (PNA) editado pelo INAG (2001) (13), a agricultura de regadio é a atividade responsável pelos maiores consumos de água. Adicionalmente, as práticas agrícolas são a causa mais generalizada e importante de deterioração da água subterrânea em zonas de agricultura intensiva.

No litoral norte de Portugal, entre as localidades de Esposende e Vila do Conde, existe uma região com longa tradição na produção de hortícolas. Até ao final do século XIX esta era uma área de pinhal. No início do século XX a paisagem foi moldada para formar um sistema agrícola único designado por *masseiras*. Os agricultores removeram milhares de toneladas de areia, criando pequenos campos alguns metros abaixo do nível inicial. Estes campos ficavam protegidos do vento, o que tornava o seu clima parecido com uma estufa. Cada campo tinha o seu poço para irrigar os vegetais. No declive cultivavam vinha com o intuito de estabilizar a areia. No entanto, desde os anos 80 do século passado, as *masseiras* iniciais têm sido substituídas por grandes *masseiras* com estufas plásticas, destinadas à produção de diferentes produtos hortícolas.

A região das *masseiras* está incluída uma zona classificada como vulnerável (ZV1) e regulada pela legislação da Diretiva 91/676/CEE (14); do Dec-Lei n.º 235/97 (15); e da Portaria 556/2003 (16). Esta classificação de vulnerável advém da poluição das águas subterrâneas por nitratos de origem agrícola. O sistema de produção utilizado na região desde a década de 60 é baseado na grande utilização de água, fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos, sendo um caso típico de agricultura intensiva, na qual são produzidos, principalmente, produtos hortícolas, fundamentais para o abastecimento das cidades do Norte de Portugal e da Galiza. Esta região também se caracteriza por possuir um solo arenoso e com aquíferos superficiais sendo, no entanto, os aquíferos subterrâneos mais vulneráveis à poluição (2). Neste contexto, conhecer o impacto das práticas agrícolas na poluição das águas subterrâneas nesta zona, bem como as oscilações ao longo do ano, é de especial relevância para avaliar o impacto da horticultura intensiva.

No Capítulo 6 desta dissertação foi elaborado um programa de monitorização da qualidade da água de poços e furos através da quantificação dos níveis de nitratos, nitritos, potássio, sódio, e resíduos de pesticidas, ao longo de um ano. Na zona de horticultura intensiva, foram selecionados oito pontos de colheita diferentes (quatro poços com profundidades que variaram entre os 7 e os 10 metros, e quatro furos artesianos com profundidades que variaram entre os 70 e 120 metros) e realizadas cinco campanhas de amostragem durante um ano.

Os nitratos e nitritos foram quantificados por HPLC/UV (17) e o sódio e o potássio por fotometria de chama. Os resíduos de pesticidas foram quantificados pela metodologia analítica descrita no Capítulo 2.

Relativamente aos parâmetros nitratos e pesticidas, a água subterrânea é considerada de boa qualidade quando os níveis não excedem 50 mg/l de nitratos e, 0,1 µg/l, no caso de um, ou 0,5 µg/l para o somatório de todos os pesticidas analisados (8).

No que respeita à composição em nitratos, estes foram quantificados em todas as amostras de água colhidas nos poços e em 50% das amostras o valor paramétrico de 50 mg/l foi excedido. A água proveniente dos furos artesianos apresentou melhor qualidade química, pois, os níveis de nitratos foram muito baixos, nalguns casos inferiores aos limites de deteção do método, como se verificou nas amostras provenientes de 2 dos quatro furos artesianos. As amostras de água de um outro furo artesiano apresentaram teores de nitrato que variaram entre 22 e 71 mg/L. Somente a água de um dos furos artesianos apresentou níveis de nitratos semelhantes aos encontrados nos poços, com concentrações de nitrato superiores a 50 mg/L em todas as amostras. Foi obtida uma elevada correlação de *Pearson* ($r=0,691$, $P<0,01$) entre a concentração de potássio e de nitratos.

Os nitritos apresentaram concentrações muito baixas ou não detetáveis, mesmo no caso de amostras provenientes de poços e furos com elevada quantidade de nitratos. O teor de sódio das amostras colhidas num dos furos artesianos era elevado, variando entre 127,2 a 166,2 mg/l, provavelmente, devido a fenómenos de intrusão salina. Nas restantes amostras o teor de sódio foi significativamente mais baixo variando entre 17,4 a 92,9 mg/l de sódio.

Na monitorização dos resíduos de 28 pesticidas (8 fungicidas, 11 inseticidas, e 9 herbicidas), num total de 40 amostras colhidas no intervalo de um ano, verificou-se que somente cinco pesticidas (*acetamiprid*, *endrin*, *pendimethalin*, *phosmet*, and *2,4D*) não foram detetados em nenhuma das amostras. Por outro lado, os fungicidas mais frequentes foram *cyprodinil*, *metalaxyl*, e *azoxystrobin*, seguidos pelo *folpet* e *fludioxonil*, os fungicidas menos abundantes foram *fenhexamid*, *iprodione*, e *tolyfluanid*. No caso dos inseticidas encontrados, os mais abundantes foram o *pirimicarb* e o *thiamethoxam*, seguidos pelo *dimethoate*, *dieldrin*, *cyromazine*, *o,p'-DDT*, *methoxychlor*, e *aldrin*. Em termos de herbicidas os mais frequentes foram a *atrazine* e *terbuthylazine* juntamente com os seus metabolitos, seguidos pelo *EPTC*, *S-metolachlor*, e *linuron*. É de destacar que alguns destes resíduos de pesticidas já não são utilizados atualmente, nomeadamente, o *EPTC*, a *atrazine* e a *terbuthylazine*, assim como os seus metabolitos, o *S-metolachlor*, a *aldrin*, a *dieldrin*, o *o,p'-DDT*, e o *methoxychlor*, pois não se encontram incluídos nos pesticidas regulamentados para utilização da UE.

O número de amostras em que a quantidade dos resíduos de pesticidas ultrapassa os valores paramétricos contemplado na Diretiva 2000/60/CE (7) e na Diretiva 2006/118/CE (8), é um indicador, que pode ser utilizado para avaliar a severidade da contaminação das águas subterrâneas. Num total de 40 amostras, 24 excederam o limite contemplado na legislação, o que significa que mais de 50% das amostras analisadas continham pelo menos um pesticida em níveis superiores ao limite de 0,1 µg/l. No conjunto das 24 amostras contaminadas 14 excediam 0,5 µg/l para a soma dos pesticidas encontrados, o que indica existir uma forte contaminação.

A frequência com que os pesticidas aparecem nas amostras também fornece uma valiosa informação sobre a poluição das águas. Por exemplo, os resíduos de *metalaxyl* e *thiamethoxam* foram detetados em mais de 20% das amostras. No caso dos resíduos de *terbuthylazine*, *desethylterbuthylazine*, e *desethylatrazine* foram detetados em mais de 10% das amostras, de realçar que estes princípios ativos não são, normalmente, utilizados na horticultura. A utilização de herbicidas nas estufas é evitada pelo recurso a plásticos pretos a cobrir o solo.

Os resultados obtidos no Capítulo 6 confirmam que na zona vulnerável, VZ1 existe uma contaminação difusa, cuja origem é difícil de verificar, mas que resulta, certamente, de práticas agrícolas erradas que contaminam a água disponível para irrigação dos campos. Técnicas quimiométricas, tais como análise de *cluster*, análise de componentes principais e análise discriminante foram usadas para compreender o impacto das práticas de horticultura intensiva na composição da água dos poços e dos furos. A análise de componentes principais, embora tenha proporcionado uma significativa redução dos dados, não permitiu claramente agrupar as amostras de acordo com a sua origem ou com a data de colheita, no entanto, permitiu observar diferenças na composição das amostras do mesmo ponto de colheita ao longo do ano e distinguir as amostras de um dos furos.

A análise de *cluster* permitiu agrupar as amostras de poços e de furos de acordo com a frequência dos pesticidas em cada data de colheita. Os resultados obtidos evidenciaram que os 8 pontos de colheita de água podem ser organizados em 3 grupos (*clusters*) com características semelhantes no que respeita à contaminação da água. Esta informação permitiu agrupar as amostras para realizar a análise discriminante e pode vir a ser útil para reduzir o número de pontos de colheita em futuros estudos. Uma *cluster* reuniu as amostras de água dos 3 furos que apresentaram baixa contaminação por pesticidas, e que se caracterizaram por uma distribuição homogênea ao longo do ano. A segunda *cluster* agrupou as amostras dos poços, que apresentaram elevadas quantidades de inseticidas e fungicidas, e grandes oscilações ao longo do ano. A terceira *cluster* incluiu as amostras provenientes do furo mais contaminado, principalmente, em herbicidas e fungicidas.

A análise discriminante foi realizada usando como variáveis independentes os teores de 17 pesticidas, nitrato, potássio e sódio e dividindo as amostras em 3 grupos (variável dependente) de acordo com a distribuição obtida, anteriormente, na análise de *cluster*. Os resultados sugerem que os teores de nitrato, sódio, *terbuthyllazinedesethyl* e *pirimicarb* são os parâmetros mais importantes para discriminar os 3 grupos.

Este estudo confirmou que a água dos poços é muito suscetível às contaminações resultantes da atividade do agricultor e das práticas dos vizinhos que lhe estão próximos. Os inseticidas e fungicidas são os produtos fitofarmacêuticos mais usados nas estufas e foram os principais contaminantes das águas dos poços. A água dos furos, embora em menor extensão, é contaminada por práticas agrícolas próximas do local do furo, mas também por práticas agrícolas em zonas mais afastadas. Um dos furos apresentou elevada contaminação por pesticidas, embora esteja localizado numa zona de cultivo de alface e outros vegetais cuja produção não requer utilização de herbicidas.

Consequentemente, esta contaminação, persistente ao longo do ano, deve ser proveniente dos campos de milho nas redondezas. É de destacar que de acordo com a literatura, os herbicidas são entre os vários tipos de pesticidas, os mais frequentemente detetados nas águas subterrâneas (18) devido: (i) ao seu modo de aplicação (pois são, geralmente, aplicados diretamente ao solo); (ii) às suas propriedades físico-químicas (geralmente, apresentam maior potencial de lixiviação porque têm elevada solubilidade na água e baixo K_{ow} , quando comparados com os inseticidas e fungicidas); (iii) elevada utilização de herbicidas a nível mundial.

Os resultados obtidos evidenciam que a produção intensiva de hortícolas tem um impacto significativo na contaminação das águas subterrâneas na zona vulnerável e que é necessário encontrar um sistema alternativo para resolver a problemática da elevada utilização de água e da sua poluição, efetuando obras de engenharia de transporte da água de outras regiões, ou através de processos de remediação biológicos e químicos, com coordenação a nível regional (19). Alguns autores afirmam que a mudança será radical e a utilização de pesticidas na produção vegetal será abandonada, mesmo em estufas (20).

Os resultados obtidos no Capítulo 6 evidenciam que a agricultura terá de melhorar a performance da produção, tal como referido pela FAO, é premente investir em soluções técnicas que produzam *more crop per drop*, só assim se vai conseguir um aumento da eficiência no uso da água e diminuição da sua contaminação (21).

10.2. Monitorização da qualidade da água de minas numa zona dedicada à cultura da vinha

As águas subterrâneas são um recurso extremamente valioso, para a vida e para a integridade dos ecossistemas. No Continente, representam cerca de 60% da água consumida, sendo este valor bastante mais elevado nas Regiões Autónomas, o que ilustra bem a importância que têm na gestão dos recursos hídricos em Portugal (22). No que se refere à qualidade, também é aceite, no geral, que as águas subterrâneas apresentam vantagens em relação às águas superficiais devido à sua relativa estabilidade química e biológica.

Na recente Diretiva para as águas subterrâneas (8) pode ler-se no ponto 2 da respetiva diretiva: “as águas subterrâneas representam as massas de água doce mais sensíveis e importantes da União Europeia e, sobretudo, também uma fonte de abastecimento público de água potável em muitas regiões” o que revela a preocupação que o tema tem suscitado às autoridades competentes.

Na maioria das circunstâncias, os aquíferos são explorados para fornecer uma quantidade de água suficiente e de qualidade aceitável, de forma a atender às necessidades de desenvolvimento regional (23). Em pequenos sistemas comunitários de abastecimento de água, a água subterrânea é quase sempre o recurso preferido. O custo da sua captação e distribuição é muito mais baixo, a captação pode ser próxima da zona em que é consumida, frequentemente, as exigências relativas a tratamentos são menores, uma vez que as são águas menos suscetíveis à poluição, e a flutuações sazonais.

A utilização dos recursos hídricos subterrâneos, tanto para consumo humano como para irrigação, remonta a tempos antigos (24). O método mais antigo e simples de captação de águas subterrâneas é a escavação de um furo no solo a uma profundidade abaixo do lençol freático (24).

A captação de águas subterrâneas pode fazer-se igualmente através de minas de água, que consistem em galerias obtidas por perfuração, escavação ou instalação horizontal de uma secção retangular ou circular em determinada formação geológica, ao longo da qual penetra a água subterrânea, e que vão de encontro a uma ou mais nascentes. Assim, as minas são condutas permeáveis nas quais a água se pode infiltrar a partir de camadas superiores ou zonas adjacentes e que se caracterizam por um fornecimento contínuo de água, que é desviada, por gravidade, através de canais ou condutas para um ponto de interesse (25).

As minas são um dos métodos mais antigos de abastecimento das populações em localidades rurais no Norte de Portugal, nomeadamente, na região do Alto Douro vinhateiro. Devido à sua origem ancestral, os habitantes desta zona associam a água das minas a uma água com elevada qualidade. No entanto, a qualidade química da água das minas depende da qualidade da água subterrânea, bem como da qualidade da água superficial que alimenta o aquífero subterrâneo. Numa zona de intensa atividade de produção de vinha é então importante avaliar a influência desta atividade agrícola na qualidade da água das minas (26).

Em Portugal, a cultura da vinha é, uma das atividades mais importantes em termos sócio-económicos. De acordo com as estatísticas agrícolas do Instituto Nacional de Estatística (INE), a cultura da vinha ocupa, atualmente, cerca de 6,5% da superfície agrícola útil, dos quais 97% são de uva para a produção de vinho (27). Entre 1993-1994 a cultura da vinha consumiu cerca de 41% do mercado de produtos fitofarmacêuticos, com destaque para os fungicidas (28).

No Capítulo 7 desta dissertação analisaram-se amostras da água recolhidas de fontanários públicos, localizados na região do Douro vinhateiro, com o intuito de

quantificar resíduos de pesticidas e disruptores endócrinos. Foi utilizada a metodologia analítica validada no Capítulo 2.

A monitorização por GC/MS de amostras de água provenientes de 9 fontanários públicos, localizados em pequenas aldeias, revelou a presença de 12 dos 31 compostos em estudo, incluindo *folpet*, *2,4-D*, *atrazine-desethyl*, *terbuthylazine-desethyl*, *dimethoate*, *terbuthylazin*, *dieldrin*, *endrin*, *o.p-DDT*, *methoxychlor*, *estrone*, e *estradiol*. Os restantes compostos não foram detetados em nenhuma das amostras.

Os níveis de pesticidas encontrados foram relativamente baixos, e frequentemente, em níveis inferiores ao limite de quantificação do método utilizado, embora num nível detetável. Nas amostras de dois fontanários não foi detetado qualquer tipo de resíduo, e nas amostras provenientes de 3 fontanários foi encontrado apenas um composto, o *2,4-D*, o *dimethoate* ou o *endrin*. Numa das amostras foram detetados 4 compostos, *estrone* e *estradiol* e mais dois resíduos de pesticidas *2,4-D* e *atrazine-desethyl*, mas todos em níveis muito baixos. A amostra mais contaminada apresentou 7 poluentes diferentes, incluindo o *folpet*, a *terbuthylazine-desethyl* e a *terbuthylanzine*, que foram quantificados, e o *dieldrin*, *o.p-DDT*, o *methoxychlor* e o *estrone*, que foram detetados em níveis inferiores ao seu LQ.

Duas amostras ultrapassaram o limite de 0,1 µg/l para um único composto ou o limite de 0,5 µg/l, para o somatório de todos os resíduos de pesticidas, contemplados na Diretiva 2000/60/CE (7) e da Diretiva 2006/118/CE (8), pois uma apresentou níveis de 0,292 µg/l para o *terbuthylazine-desethyl* e de 0,369 µg/l para o *terbuthylazine*, resultando numa concentração total de todos os resíduos de 0,661 µg/l e a outra apresentou um valor de 0,108 µg/l para o metabolito *terbuthylazine-desethyl*. Os resultados das restantes amostras encontravam-se de acordo com os limites estabelecidos para os resíduos de pesticidas.

De todos os contaminantes detetados, nove apresentam potencial efeito como disruptores endócrinos (*estrone*, *estradiol*, *o.p-DDT*, *methoxychlor*, *dieldrin*, *endrin*, *2,4-D*, *dimethoate*, *folpet*). De realçar que alguns dos resíduos encontrados, nomeadamente *o.p-DDT*, *methoxychlor*, *dieldrin* e *endrin* já não são permitidos na agricultura europeia, mas devido à sua persistência no meio ambiente ainda hoje são detetados em diversas matrizes ambientais, incluindo as águas subterrâneas. A água subterrânea, como compartimento ambiental, é substancialmente diferente de outros sistemas aquosos. As temperaturas baixas, a fraca diluição e uma população microbiológica diminuta são fatores que favorecem a persistência de contaminantes orgânicos (2).

Os resultados obtidos nesta monitorização indicam que a ideia generalizada de que a água das minas tem elevada qualidade nem sempre se confirma. A amostragem foi

realizada numa área de cerca de 100 km², no entanto, verificaram-se diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de pesticidas, e não foi possível definir um padrão entre as mesmas. O carácter intensivo da agricultura da área contribuiu para a diversidade de pesticidas encontrados.

Referências

1. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trac-Trend Anal Chem.* 2011;30(6):814-26.
2. Diaz-Cruz MS, Barcelo D. Trace organic chemicals contamination in ground water recharge. *Chemosphere.* 2008;72(3):333-42.
3. Batista S, Silva E, Cerejeira MJ. Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em diversos ecossistemas agrícolas do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral. *Revista de Ciências Agrárias.* 2006;XXIX:102-16.
4. Poissant L, Beauvais C, Lafrance P, Deblois C. Pesticides in fluvial wetlands catchments under intensive agricultural activities. *Sci Total Environ.* 2008;404(1):182-95.
5. Conselho das Comunidades Europeias. Diretiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 230, 1-32.*
6. Conselho da União Europeia. Diretiva 98/83/CE do conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 330, 30-54.*
7. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Diretiva 2000/60/CE Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 327, 1-72.*
8. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Diretiva 2006/118/CE Parlamento Europeu e do Conselho relativa à protecção das águas subterrâneas contra a poluição e a deterioração. *Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 372, 19-31.*
9. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int J Env Res Pub He.* 2011;8(5):1402-19.
10. Hildebrandt A, Guillaumon M, Lacorte S, Tauler R, Barcelo D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.* 2008;42(13):3315-26.
11. Santos LMR, Costa AM, Arenales MN, Santos RHS. Sustainable vegetable crop supply problem. *Eur J Oper Res.* 2010;204(3):639-47.
12. Stefanelli D, Goodwin I, Jones R. Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Res Int.* 2010;43(7):1833-43.

13. Instituto da Água (INAG). Plano Nacional da Água – Introdução, caracterização e diagnóstico da situação actual dos recursos hídricos. Lisboa: 2001; Disponível em: http://www.inag.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=9:Plano%20nacional%20da%20%C3%A1gua&catid=4:pna&Itemid=21 [Acedido em 2012].
14. Conselho das Comunidades Europeias. Directiva 91/676/CEE do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991, relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola. Jornal Oficial da União Europeia. Série L, nº 375, 1-8.
15. Ministérios do Ambiente. Decreto de Lei nº 235/97 de 3 de Setembro. Diário da República. 1ª Série-B, nº 159, 4640-4644.
16. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Portaria n.º 556/2003 de 12 de Julho. Diário da República. 1ª Série-A, nº 203, 3998-4001.
17. Pinto E, Petisca C, Amaro LF, Pinho O, Ferreira IMPLVO. Influence of Different Extraction Conditions and Sample Pretreatments on Quantification of Nitrate and Nitrite in Spinach and Lettuce. *J Liq Chromatogr R T*. 2010;33(5):591-602.
18. Funari E, Donati L, Sandroni D, Vighi M. Pesticide levels in groundwater: Values and limitations of monitoring. In: Vighi M, Funari E, editors. *Pesticide risk in groundwater*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1995. p. 3-34.
19. Carvalho FP. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ Sci Policy*. 2006;9(7-8):685-92.
20. van Lenteren JC. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? *Crop Prot*. 2000;19(6):375-84.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). More crop per drop. The role of agriculture is essential in resolving the world's water problems. 2003; Disponível em: <http://www.fao.org/english/newsroom/focus/2003/water.htm> [Acedido em 2012].
22. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos (APRH). Água Subterrânea. 2012; Disponível em: <http://www.aprh.pt> [Acedido em 2012].
23. Cabrera MC, Custodio E. Evolution of groundwater intensive development in the coastal aquifer of Telde - (Gran Canaria, Canarian archipelago, Spain). *Int Assoc Hydrogeol*. 2005;7:295-306.
24. Smet J. Small Community Water Supplies: Technology, People and Partnership: IRC International Water and Sanitation Centre; 2002.

25. Kresic N. Hydrogeology and Groundwater Modeling. Second edition ed. Florida: CRC Press-Taylor & Francis Group; 2007.
26. Miller GW. Integrated concepts in water reuse: managing global water needs. Desalination. 2006;187(1-3):65-75.
27. Instituto Nacional de Estatística IP. Estatísticas Agrícolas 2008. Lisboa: INE; 2008.
28. Amaro P. A Protecção Integrada. Lisboa: ISA/Press; 2003.

PARTE IV

Capítulo 11

Conclusões

Capítulo 11. Conclusões

Neste capítulo reuniram-se as conclusões globais do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação, organizadas de acordo com os objetivos delineados e os resultados obtidos.

A descoberta, após a 2ª Guerra Mundial, de numerosas moléculas altamente eficazes no combate a pragas e de fácil utilização pelo agricultor, produzidas por empresas com poderosas estruturas comerciais, conduziu a uma utilização massiva dos produtos fitofarmacêuticos. Consequentemente, verificou-se um aumento da produção agrícola, associado a uma melhoria das condições de vida. No entanto, não se deve esquecer, que os resíduos de pesticidas podem provocar efeitos negativos no Homem e no meio ambiente. Um dos grandes desafios que se coloca, atualmente, consiste em criar condições que permitam contribuir para que a proteção das culturas se faça com o mínimo impacto na saúde humana e no ambiente. Neste contexto, tornou-se imperiosa a monitorização dos resíduos de pesticidas, como forma de prevenção da exposição a estes contaminantes, ou com o intuito de estabelecer medidas de remediação.

Diversas entidades regulamentares limitaram a utilização dos produtos fitofarmacêuticos e, assim, tornou-se urgente e essencial o desenvolvimento de métodos analíticos multirresíduo, com recurso a técnicas de preparação da amostra fiáveis, que permitam a monitorização dos resíduos de pesticidas em diferentes matrizes.

As metodologias otimizadas e validadas neste trabalho revelaram-se adequadas para a deteção e quantificação de diferentes resíduos de pesticidas de várias famílias químicas, permitindo obter resultados analíticos rigorosos de alta qualidade, com a vantagem de minimizar o consumo de solventes orgânicos e de reagentes.

A técnica de SPE é o método mais utilizado e convencionalmente aceite como método de extração de resíduos de pesticidas em amostras de águas. O método de SPE-GC/MS foi validado, de acordo com as orientações emanadas pela *International Conference on Harmonization* (ICH), para a determinação de pesticidas de diferentes famílias químicas e estrogénios, em água. A preparação da amostra por SPE apresentou boa eficiência de extração, fácil utilização, e baixo consumo de solventes orgânicos. A utilização de um modelo de regressão linear ponderada diminuiu os erros relativos no extremo inferior da curva de calibração e permitiu maior exatidão perto do limite de deteção.

O método de SPME-HPLC/DAD foi apropriado para a determinação de resíduos de pesticidas, vulgarmente usados na produção de alface, permitindo a sua quantificação em níveis inferiores ao respetivo limite máximo de resíduo. A otimização das condições de extração por RSM permitiu selecionar as melhores condições para a extração dos

resíduos da matriz, permitindo realizar, simultaneamente, a extração e a purificação dos extratos, reduzindo, significativamente, o tempo necessário para a preparação das amostras. As principais vantagens associadas a este método consistiram na obtenção de um elevado grau de purificação dos compostos em estudo, aliado a uma redução do consumo de solventes orgânicos e à utilização de um detetor, geralmente disponível nos laboratórios que fazem controlo de qualidade destas amostras.

A combinação do processo de extração de QuEChERS com o processo de DLLME constituiu uma forma simples e pouco dispendiosa de purificar e concentrar os extratos de tomate, para a seguir se proceder à separação e quantificação dos resíduos de pesticidas por HPLC/DAD e por GC/MS.

O método QuEChERS/DLLME foi associado à separação por HPLC e deteção por DAD para a análise de pesticidas, de diferentes famílias químicas, em amostras de tomate. De realçar, que este detetor embora menos sensível que o de MS, tem a vantagem de ser mais fácil de adquirir e utilizar. Adicionalmente, aplicando a técnica de HPLC é possível a análise de compostos polares que não são facilmente analisados por GC. Os resíduos de pesticidas foram quantificados em níveis inferiores aos seus LMR, na matriz de tomate, que é rica em compostos interferentes, nomeadamente, carotenóides, ácidos clorogénicos e rutina. Este facto, deve-se em grande parte, ao elevado fator de enriquecimento alcançado por DLLME em conjunto com a purificação proporcionada pela SPE dispersiva do QuEChERS. Com recurso a uma otimização por RSM, foi possível obter as condições apropriadas das diferentes variáveis de extração e um compromisso entre a purificação da amostra e a maximização do sinal analítico.

A metodologia de extração por QuEChERS/DLLME, foi também, acoplada a GC-MS, pois, este tipo de instrumento apresenta uma grande robustez e sensibilidade, permitindo diferenciar, claramente, os resíduos de pesticidas das interferências. Deste modo, foi possível analisar um maior número de resíduos de pesticidas em cada análise cromatográfica e, simultaneamente, quantificar os resíduos de pesticidas em níveis inferiores aos seus LMR.

Os dois métodos de QuEChERS/DLLME associados a diferentes técnicas cromatográficas e detetores foram validados para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de tomate. Estes métodos podem complementar-se, uma vez que os resíduos determinados por DAD apresentam uma melhor performance na análise por HPLC, e os resíduos determinados por MS apresentam uma boa performance analítica, quando analisados por cromatografia gasosa. De realçar, que devido à maior eficiência e robustez da técnica de GC/MS na análise dos resíduos de pesticidas, não foi necessária uma purificação tão elevada como na técnica de HPLC e por isso as etapas

de SPE dispersivo da técnica de QuEChERS foram eliminadas, o que permitiu simplificar a preparação da amostra.

A validação dos métodos analíticos desenvolvidos foi especialmente relevante para obter resultados rigorosos e fiáveis. Deste modo, foram avaliados os efeitos de matriz, a exatidão e precisão de cada método, os limites de deteção e de quantificação, intervalo de linearidade, eficiência da extração, estabilidade e robustez.

Os efeitos de matriz foram determinados em todas as metodologias otimizadas, por avaliação da intensificação ou supressão de sinal analítico obtido na injeção dos extratos em comparação com a injeção de soluções padrão com as mesmas concentrações. O efeito de matriz foi ultrapassado realizando sempre as calibrações na matriz em estudo, sem resíduos de pesticidas, à qual foram adicionadas as quantidades de padrão desejadas e extraídas nas mesmas condições que foram aplicadas às amostras. Por sua vez, as calibrações efetuadas com recurso a um modelo de regressão linear ponderada permitiram a diminuição dos erros relativos das medições nas concentrações mais baixas e, conseqüentemente, a obtenção de maior exatidão.

As metodologias analíticas validadas foram aplicadas na avaliação de resíduos de pesticidas em amostras de alface, tomate e águas subterrâneas de diferentes origens, pois estas são importantes vias de exposição dos humanos e animais aos resíduos de pesticidas.

A técnica de SPME-HPLC/DAD foi usada na monitorização de resíduos de pesticidas, geralmente usados na produção de alface, produzida em estufas durante o inverno, com o intuito de avaliar a dissipação de alguns pesticidas desde a sua aplicação até à colheita. A análise das amostras de alface revelou que os produtos fitofarmacêuticos aplicados tinham como princípios ativos os compostos *fenhexamid* e *folpet*. Somente estes dois pesticidas foram quantificados em algumas das amostras de alface. Os restantes pesticidas avaliados neste trabalho (*azoxystrobin*, *cyprodinil*, *fludioxonil*, *iprodione*, *metalaxyl M*, *tolyfluanid*, *acetamiprid*, *pirimicarb*), não foram detetados nas amostras analisadas. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que no final do intervalo de segurança estipulado, os resíduos de pesticidas já se encontravam em níveis inferiores ao LMR estabelecido, em conformidade com a legislação europeia, não apresentando risco para o consumidor.

Na outra matriz monitorizada neste trabalho, o tomate, foi usada a técnica de QuEChERS/DLLME com deteção por GC/MS, e aplicada na análise de 20 amostras de 4 variedades de tomate, comercialmente disponíveis. Não foi detetado nenhum dos 30 pesticidas em estudo em 13 amostras das 20 amostras analisadas. Somente 7 amostras apresentavam 1 ou 2 resíduos de pesticidas abaixo do respetivo LMR estabelecido pela

UE. Os resultados indicam que o tomate, mesmo o que é produzido em estufa durante o inverno, que é a fase do ano em que se pode verificar maior necessidade de utilização de produtos fitofarmacêuticos, é seguro no que respeita aos resíduos de pesticidas presentes. Somente a quantidade detetada de *tolyfluanid* em duas amostras de tomate revelou alguma preocupação, porque este produto fitofarmacêutico não é homologado pela legislação portuguesa para esta matriz.

A monitorização de pesticidas em águas subterrâneas com recurso a uma técnica de SPE-GC/MS, realizada em duas regiões de intensa atividade agrícola, confirmou que este compartimento pode ser um perigoso reservatório das substâncias ativas dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na agricultura.

No que respeita à qualidade das águas subterrâneas na zona de horticultura intensiva, verificou-se que esta não se encontrava apenas poluída com nitratos (como o esperado), mas, também, com resíduos de pesticidas. As amostras recolhidas de poços apresentavam, geralmente, níveis superiores de resíduos de pesticidas, quando comparados com as amostras obtidas através de furos artesianos localizados na mesma zona.

No caso da monitorização da água subterrânea proveniente de 9 minas utilizadas para abastecimento público, verificou-se que somente a água de 2 minas não apresentou vestígios de pesticidas, e que nas restantes 7 minas foi possível detetar a presença de pelo menos um pesticida. A água de 2 minas apresentou uma poluição difusa, em que alguns pesticidas apresentavam níveis de pesticidas superiores aos limites máximos de resíduos permitidos nas águas para consumo humano. Os resultados obtidos contrariaram a ideia generalizada de que este tipo fontes de água apresenta sempre uma elevada qualidade da água.

Os níveis elevados de resíduos de diversos pesticidas são indicadores de más práticas agrícolas utilizadas no passado recente ou longínquo. Nas zonas agrícolas estudadas, demonstra-se que foram aplicadas, nas últimas décadas, grandes quantidades de pesticidas para destruir pragas, doenças e infestantes que competem com a produção, e que devido a fenómenos de lixiviação, entraram nas águas subterrâneas onde permanecem e dificilmente se degradam.

Nestas zonas, que constituem importantes zonas agrícolas com forte necessidade de água de rega, urge resolver a questão da qualidade da água através do controlo da sua poluição. Para este efeito deverão ser realizadas importantes obras de engenharia de transporte da água de outras regiões, ou através de processos de remediação com o recurso a produtos biológicos e químicos, com uma organizada coordenação a nível regional.

Este trabalho vai de encontro às tendências já evidenciadas na Europa de abandono da agricultura intensiva, nascida com a revolução verde, e substituída por exigentes formas de agricultura sustentável, como a produção integrada e a agricultura biológica.

Perspetivas futuras

Na atualidade, está disponível uma grande quantidade e diversidade de métodos analíticos para a determinação de resíduos de pesticidas. No entanto, os métodos frequentemente utilizados para a extracção destes compostos, em diferentes tipos de amostras, são muito demorados, envolvem múltiplos passos, que propiciam a perda de analitos, e utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos. As estratégias modernas em química analítica envolvem o recurso a métodos multirresíduo, que tentam conciliar no mesmo método, de uma forma simples e rápida, a análise de diferentes compostos, com elevada qualidade dos resultados analíticos.

As metodologias de QuEChERS e DLLME seguem a tendência atual de miniaturização e redução de solventes e mostraram-se muito eficientes na extração e concentração dos diferentes resíduos de pesticidas. No caso da extração por DLLME poderão vir a ser utilizados novos solventes de extracção, de forma a melhorar os factores de enriquecimento, minimizando também o consumo de solventes utilizados hoje em dia. Uma alternativa é a utilização de líquidos iónicos, que apresentam a vantagem de serem pouco voláteis, e não apresentarem risco de explosão ou toxicidade elevada, deste modo, será possível reduzir a perigosidade do solvente de extracção. Normalmente, os solventes utilizados na extração por DLLME são incompatíveis com a injeção direta no HPLC, pois, a sua elevada hidrofobicidade implica que não sejam miscíveis com os eluentes geralmente utilizados. Por outro lado, é de prever que irão surgir novas formas engenhosas de automatização deste tipo de técnicas, para reduzir o tempo de preparação da amostra. Esta técnica devido ao elevado fator de enriquecimento dos compostos a analisar, é promissora na aplicabilidade em novas matrizes de interesse.

A utilização de novos sorventes de d-SPE na metodologia de QuEChERS e novos materiais de revestimento das fibras de SPME poderá contribuir para melhorar a seletividade e a remoção de compostos interferentes, permitindo obter extratos mais puros e livres de interferências.

No que respeita à monitorização dos diferentes resíduos de pesticidas em amostras ambientais e alimentares, a preocupação têm-se centrado nos resíduos dos princípios ativos utilizados nas atividades agrícolas, no entanto, surge, atualmente, a preocupação

com os metabolitos gerados no meio ambiente ou decorrentes do metabolismo de dissipação nas plantas. Devido à sua natureza, estes compostos são biologicamente ativos e muitos podem ser tóxicos. Frequentemente, os metabolitos dos pesticidas são detectados em águas subterrâneas em concentrações mais elevadas do que a concentração dos resíduos das substâncias ativas utilizadas na agricultura. Assim, novos estudos de identificação e monitorização serão necessários, de forma a avaliar os potenciais riscos da exposição a estes compostos.